

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller



Immunfluoreszenz-Basierte Hochdurchsatzanalyse Identifiziert MK5 als Myc-Regulierende Kinase

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Theresia Kreß

aus Kaisten
Marburg an der Lahn, 11. Februar 2011

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 02.05.2011 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Eilers

Drittgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am 20.05.2011

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Kress TR, Cannell IG, Brenkman AB, Samans B, Gaestel M, Roepman P, Burgering BM, Bushell M, Rosenwald A, Eilers M. The MK5/PRAK Kinase and Myc Form a Negative Feedback Loop that Is Disrupted during Colorectal Tumorigenesis. *Molecular Cell*, 2011 Feb 18;41(4)

Cannell IG, Kong YW, Johnston SJ, Chen ML, Collins HM, Dobbyn HC, Elia A, Kress TR, Dickens M, Clemens MJ, Heery DM, Gaestel M, Eilers M, Willis AE, Bushell M (2010). p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 23;107(12):5375-80.

Für meine Eltern

1 Einleitung	1
1.1 Der onkogene Transkriptionsfaktor Myc	1
1.1.1 Familie und Aufbau der Myc-Onkoproteine	1
1.1.2 Molekulare und biologische Funktionen von Myc	3
1.1.3 Deregulation von Myc in Tumoren	6
1.1.4 Die Rolle von Myc in Tumoren	11
1.2 Hochdurchsatzanalyse mittels RNA-Interferenz	13
1.2.1 RNA-Interferenz	13
1.2.2 RNA-Interferenz-Bibliotheken	14
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	17
 2 Materialien	 18
2.1 Bakterienstämme und Zelllinien	18
2.1.1 Bakterienstämme	18
2.1.2 Zelllinien	18
2.2 Kultivierungsmedien und Zusätze	19
2.2.1 Medien und Antibiotika zur Bakterienkultivierung	19
2.2.2 Medien und Zusätze für die Säugerzellkultivierung	19
2.3 Nukleinsäuren	21
2.3.1 RNAi-Bibliotheken zur Hochdurchsatz-Analyse von Kinasen	21
2.3.2 Primer	22
2.3.3 Oligonukleotide	25
2.3.4 Plasmide	26
2.4 Antikörper	29
2.4.1 Primärantikörper	29
2.4.2 Sekundärantikörper	30

2.5 Chemikalien	30
2.6 Standards und Enzyme	31
2.6.1 Standards	31
2.6.2 Enzyme und Kits	31
2.7 Puffer und Lösungen	31
2.8 Gebrauchsmaterialien	35
2.9 Geräte, Membranen und Filme	35
3. Methoden	37
3.1 Molekularbiologische Methoden	37
3.1.1 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation	37
3.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	37
3.1.3 Messung der Nukleinsäurekonzentration	38
3.1.4 Restriktionsanalyse von DNA	38
3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente	39
3.1.6 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel	39
3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	39
3.1.8 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden	40
3.1.9 Isolation von RNA	40
3.1.10 DNase I-Verdau von RNA-Proben	41
3.1.11 cDNA-Synthese	41
3.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.2 Zellbiologische Methoden	46
3.2.1 Auftauen von Zellen	46
3.2.2 Passagieren von Zellen	46
3.2.3 Einfrieren von Zellen	47

3.2.4 Transfektion von Plasmid-DNA	47
3.2.5 Transfektion von doppelsträngigen Oligonukleotiden (siRNA, miRNA)	48
3.2.6 Retrovirale Infektion von Säugerzellen	49
3.2.7 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie	50
3.2.8 Kristallviolett-Färbung	51
3.3 Proteinbiochemische Methoden	51
3.3.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	51
3.3.2 Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten	52
3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	52
3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
3.3.5 Nachweis von Proteinen im Polyacrylamid-Gel durch Coomassie-Färbung	53
3.3.6 Immunoblot	53
3.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz	54
3.3.8 Bestimmung der Proteinhalbwertszeit	55
3.3.9 Radioaktive Analyse der Kinase-Aktivität <i>in vitro</i>	55
3.3.10 <i>In vivo</i> -metabolische Markierung von Proteinen zur Bestimmung der Translationsrate	56
3.3.11 Immunpräzipitation	57
3.3.12 Chromatin-Immunpräzipitation	57
3.3.13 Demethylierung von potentiellen CpG-Inseln <i>in vivo</i>	60
3.4 Bioinformatische Analyse	61
3.4.1 Nukleinsäure-Analyse	61
3.4.2 Bestimmung von putativen CpG-Inseln	61

4. Ergebnisse	62
4.1 Identifikation von MK5 als Myc-regulierende Kinase mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-basierten Hochdurchsatzanalyse	62
4.1.1 Aufbau und Etablierung der Hochdurchsatzanalyse	62
4.1.2 Durchführung und Messung der <i>Screens</i>	65
4.1.3 Auswertung der <i>Screens</i>	66
4.1.4 Verifizierung der <i>Screens</i> identifiziert MK5 als Myc-regulierende Kinase	70
4.2 MK5 reguliert die <i>MYC</i> -Translation über miR-34b/c	72
4.2.1 MK5 reguliert die Myc-Proteinexpression	72
4.2.2 MK5 reguliert nicht die <i>MYC</i> -mRNA-Expression	74
4.2.3 siMK5 erhöht die <i>MYC</i> -Translation durch Reduktion von miR-34b/c	75
4.2.4 Depletion von MK5 erhöht die <i>MYC</i> -Translation p53-unabhängig über FoxO-Transkriptionsfaktoren	81
4.3 MK5 phosphoryliert FoxO3a und beeinflusst den FoxO3a-induzierten Wachstumsarrest	86
4.3.1 MK5 phosphoryliert FoxO3a <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	86
4.3.2 MK5 induziert die nukleäre FoxO3a-Akkumulation durch Phosphorylierung an Serin 215	92
4.3.3 Nicht durch MK5 phosphorylierbares FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der miR-34b/c-Induktion und der <i>MYC</i> -Regulation	93
4.3.4 FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der Wachstumshemmung	98
4.4 MK5 ist ein direktes Myc-Zielgen	100
4.5 Mit fortschreitender Kolontumorgenese wird MK5 zunehmend reprimiert	104
4.5.1 MK5 ist in gesunden Kolonepithelzellen exprimiert	104
4.5.2 MK5 induziert Differenzierungsmarker in Kolonkarzinomzellen	105
4.5.3 Die MK5-Protein- und MK5-mRNA-Expression ist im Kolonkarzinom reduziert verglichen mit normalem Kolonepithelium	107
4.5.4 Der MK5-Promotor ist in Kolonkarzinomzelllinien nicht hypermethyliert	109

5 Diskussion	111
5.1 Hochdurchsatzanalyse identifiziert MK5 als Myc-regulierende Kinase	111
5.2 Die Proteinkinase MK5	112
5.2.1 Familie und Struktur der Kinase MK5	112
5.2.2 Biologische Funktionen von MK5	113
5.2.3 Regulation von MK5	115
5.3 MK5 reguliert die Myc-Expression und das Zellwachstum p53-unabhängig	117
5.3.1 MK5 beeinflusst die Myc-Proteinexpression Zelltyp-unabhängig	117
5.3.2 MK5 hemmt das Zellwachstum	118
5.3.3 MK5 beeinflusst die Myc-Proteinmenge p53-unabhängig über miR-34b/c und das 3'-UTR der <i>MYC</i> -mRNA	119
5.4 FoxO-Transkriptionsfaktoren	120
5.4.1 Die Familie der FoxO-Transkriptionsfaktoren	120
5.4.2 Molekulare und biologische Funktionen von FoxO-Proteinen	121
5.4.3 Regulation von FoxO-Proteinen durch Phosphorylierung	122
5.5 MK5 induziert den Wachstumsarrest über FoxO3a, miR-34b/c und Myc	123
5.5.1 MK5 phosphoryliert FoxO3a <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> und führt zu dessen nukleärer Anreicherung	123
5.5.2 MK5-Phosphorylierungs-defizientes FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der <i>MYC</i> -Regulation und der Wachstumshemmung	124
5.6 MK5 ist ein direktes Myc-Zielgen	128
5.7 Myc, MK5, FoxO3a und miR-34/c bilden einen negativen Rückkopplungsmechanismus	129
5.8 Die MK5-Expression im Kolonkarzinom sinkt mit zunehmender Malignität	130
5.9 Die Rolle des Myc-MK5-FoxO3a-miR-34b/c-Rückkopplungsmechanismus im kolorektalen Karzinom	133
5.10 Tumorsuppressive Funktionen von MK5	134

6. Zusammenfassung	136
7. Literaturverzeichnis	137
8. Anhang	153
8.1 Abkürzungsverzeichnis	153
8.2 Lebenslauf	160
8.3 Danksagung	161
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung	162

1 Einleitung

1.1 Der onkogene Transkriptionsfaktor Myc

Für die Homöostase von Zellen, Geweben und Organismen ist eine genaue Regulation von Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Apoptose essentiell. Tumoren entstehen, wenn Zellen unkontrolliert proliferieren oder vom Organismus durch Apoptose nicht eliminiert werden. Die an der Krebsentstehung beteiligten Gene werden Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene genannt, je nachdem, ob sie die Tumorentstehung fördern oder unterdrücken. Onkogene nennt man die Gene, die eine unkontrollierte Proliferation oder eine neoplastische Transformation von Zellen induzieren bzw. die Induktion von Apoptose inhibieren können. Onkogene entstehen aus sogenannten Proto-Onkogenen durch Veränderungen des Erbgutes, wie z.B. durch Mutationen oder durch Veränderungen des Regulationsmechanismus ihrer Expression. Tumorsuppressorgene hingegen sind Gene, die den Zellzyklus inhibieren oder Apoptose auslösen. Durch Überexpression von Onkogenen oder durch Unterdrückung von Tumorsuppressoren erhalten Zellen die Fähigkeit zur Tumorbildung. Bei der *MYC*-Genfamilie handelt es sich um Onkogene, deren Expression in etwa 70% aller humanen Tumoren erhöht ist (Nilsson and Cleveland, 2003).

1.1.1 Familie und Aufbau der Myc-Onkoproteine

1978 wurde das Onkoprotein Myc erstmals beschrieben. Das virale v-Myc induzierte bei Infektion mit dem MC29-Virus in Hühnern die Leukämie Myelocytomatose, die dem *MYC*-Gen den Namen gab (Sheiness et al., 1978). Kurz darauf wurde das zelluläre Homolog c-Myc (Myc; *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) erst bei Hühnern, später beim Menschen identifiziert (Hann et al., 1983; Hayward et al., 1981). Myc ist evolutionär hoch konserviert (Watson et al., 1983) und findet sich neben Vertebraten auch in *Drosophila* (Gallant et al., 1996). Zur Familie der humanen Myc-Proteine zählen Myc, N-Myc und L-Myc.

Das Myc-Protein enthält mehrere konservierte Domänen mit unterschiedlichen Funktionen (Übersichtsartikel: (Meyer and Penn, 2008)). Im N-terminalen Bereich befindet sich die Transaktivierungsdomäne mit den Myc-Boxen I und II. Zentral gelegen ist die Myc-Box III, während die Myc-Box IV, zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS), die DNA-

Bindedomäne (basische Region) und die Dimerisierungsdomäne (Helix-Loop-Helix und Leucin-Zipper) am C-terminalen Ende lokalisiert sind (Abb. 1).

Über die Interaktionen mit Kofaktoren kann die Transaktivierungsdomäne (TAD) Proliferation, Transformation, Apoptose und Differenzierung regulieren. Die in der TAD gelegene Myc-Box I ist notwendig für die Transformation von primären embryonalen Rattenfibroblasten durch Ras und Myc (Stone et al., 1987). Zudem spielt sie eine wichtige Rolle für die Myc-Stabilität, da die Phosphorylierung von Threonin 58 und Serin 62 innerhalb der Myc-Box I den proteasomalen Abbau reguliert (Sears et al., 2000). An die Myc-Box II binden Kofaktoren wie z.B. TRRAP (*transactivation/transformation-associated protein*) (McMahon et al., 2000) oder Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) (Kim et al., 2003; von der Lehr et al., 2003). Diese Interaktionen beeinflussen die transkriptionelle Aktivität und das Transformationspotential von Myc. Während die Myc-Box I nur für die transkriptionelle Aktivierung nötig ist (Amin et al., 1993), vermittelt die Myc-Box II sowohl die Transkriptionsaktivierung als auch -repression (Li et al., 1994).

Auch die Myc-Box III ist an der Transkriptionsrepression beteiligt, vermindert die proapoptotische Funktion von Myc und steigert somit das Transformationspotential (Herbst et al., 2005). Die Myc-Boxen II und III sind hochkonservierte Bereiche innerhalb des Myc-Proteins, was auf essentielle Funktionen hinweisen würde. Allerdings konnte durch Deletionsmutanten von Myc in *Drosophila* gezeigt werden, dass die Deletion der Myc-Box II oder der Myc-Box III die Myc-Funktion *in vivo* vergleichsweise schwach beeinträchtigt (Schwinkendorf and Gallant, 2009).

Die Myc-Box IV reguliert DNA-Bindung, Apoptose und Transformation, aber nicht Zellproliferation (Cowling et al., 2006). Teilweise überlappend mit der Myc-Box IV befinden sich die nukleären Lokalisationssignale. Dabei sind die neun Aminosäuren des ersten NLS für die Translokation von Myc in den Zellkern ausreichend, während das zweite NLS eine untergeordnete Rolle spielt (Dang and Lee, 1988).

Am C-Terminus sind die basische Region (BR), das Helix-Loop-Helix-Motiv (HLH) und der Leucin-Zipper (LZ) gelegen. Die BR vermittelt die sequenzspezifische DNA-Bindung (Prendergast et al., 1991), während die HLH-LZ-Domäne für die Dimerisierung verantwortlich ist (Dang et al., 1989; Davis and Halazonetis, 1993). Die Interaktion des Myc-Proteins mit Kofaktoren wie z.B. Miz1 (*Myc interacting Zinc finger protein 1*) (Peukert et al., 1997) oder dem Partnerprotein Max (*Myc associated factor X*) (Blackwood

and Eisenman, 1991) findet über die HLH-LZ-Domäne statt. Lange Zeit ging man davon aus, dass dieser C-terminale Bereich für alle Funktionen von Myc essentiell ist. Mittlerweile wurde beschrieben, dass Myc auch C-Terminus-unabhängige Funktionen besitzt. So kann beispielsweise die Expression der TAD den Wachstumsdefekt von Myc^{-/-}-Fibroblasten teilweise aufheben, indem sie die Translationsrate von einigen mRNAs erhöht (Cowling and Cole, 2007).

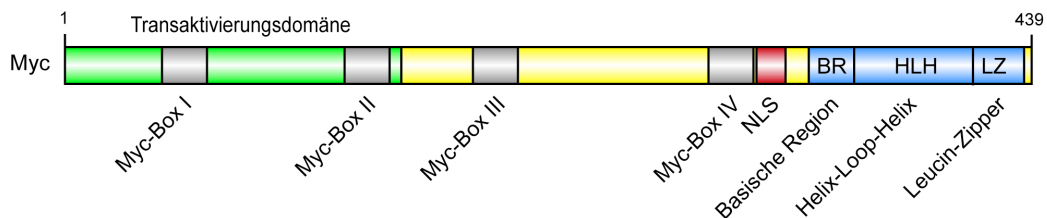


Abb. 1: Primärstruktur des humanen Myc-Onkoproteins.

Am N-Terminus befindet sich die für die transkriptionelle Aktivität notwendige Transaktivierungsdomäne, die die Myc-Boxen I und II beinhaltet. Im zentralen Bereich liegt die Myc-Box III. Am C-terminalen Ende des Proteins sind die Myc-Box IV und die nukleären Lokalisationssignale (NLS) lokalisiert. Außerdem befinden sich hier die für die DNA-Bindung wichtige basische Region (BR) und die Helix-Loop-Helix- bzw. die Leucin-Zipper-Domänen.

1.1.2 Molekulare und biologische Funktionen von Myc

Die Deletion des *MYC*-Gens führt in Mäusen zur embryonalen Lethalität vor dem Tag E 10.5, was auf Defekte multipler Organe (z.B. Herz, Pericardium und Neuralrohr) zurückgeführt wurde (Davis et al., 1993). Mittlerweile weiß man, dass die *MYC*-Deletion zu einer plazentalen Insuffizienz führt und die von Davis beobachteten Organdefekte sekundäre Auswirkungen darstellen (Dubois et al., 2008).

Myc-Proteine sind fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert, wobei sie die Transkription sowohl aktivieren als auch reprimieren können. Beides findet über direkte DNA-Bindung statt. Zudem wurden auch transkriptionsunabhängige Myc-Funktionen, wie z.B. Translationsinduktion oder DNA-Replikation, beschrieben (Cole and Cowling, 2009; Dominguez-Sola et al., 2007; Herold et al., 2008).

1.1.2.1 Transkriptionelle Regulation durch Myc

Myc bindet über die BR-HLH-LZ-Domäne mit seinem Partnerprotein Max. Für die verschiedenen biologischen Funktionen von Myc, wie z.B. für transkriptionelle Genaktivierung, Transformation und Apoptose, ist die Dimerisierung von Myc und Max essentiell. Das Myc:Max-Heterodimer bindet an spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten E-Boxen (Blackwell et al., 1990). Die Bindung an E-Boxen, bei denen man kanonische (CACGTG) von nicht-kanonischen (CANNTG; N kann durch jede der vier Basen ersetzt werden) unterscheidet, ist wichtig für die transkriptionelle Aktivität. Für die Genaktivierung rekrutiert Myc Koaktivatoren wie z.B. TRRAP, TIP60 (*Tat interacting protein, 60 kDa*), TIP48 (*TBP interacting protein, 48 kDa*), GCN (*general control non-derepressible*), P300 oder Skp2 (Übersichtsartikel: (Adhikary and Eilers, 2005)).

Myc reprimiert Gene, indem es über weitere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Sp-1 (*specificity protein-1*) und Miz1 (Übersichtsartikel: (Wanzel et al., 2003)) an die Promotoren rekrutiert wird. Der am besten charakterisierte Mechanismus involviert das Protein Miz1 (Peukert et al., 1997). Myc interagiert mit Miz1 an Promotoren und reprimiert die Transaktivierung der Miz1 induzierten Gene, wie z.B. *CDKN2B* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2B*) (Staller et al., 2001) oder *CDKN1A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) (Herold et al., 2002; Seoane et al., 2002) (Abb. 2).

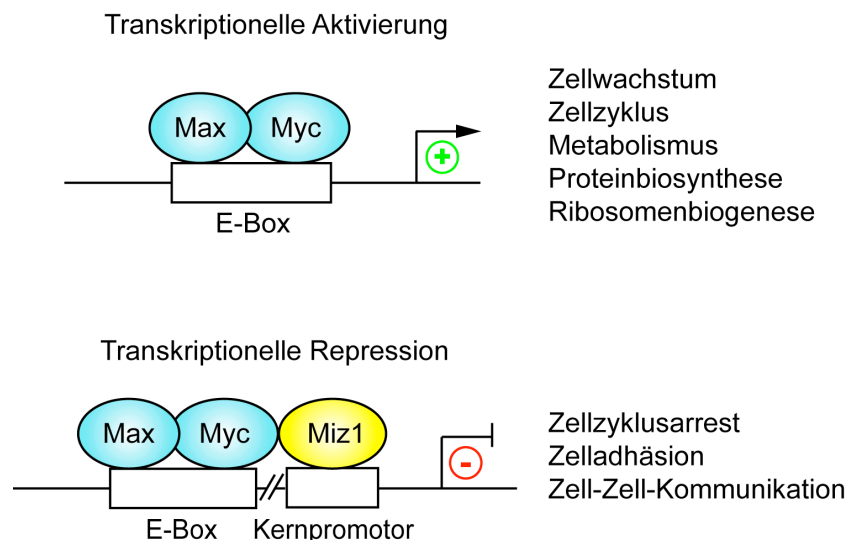


Abb. 2: Transkriptionelle Funktionen des Myc-Onkoproteins.

Das Myc:Max-Heterodimer bindet an E-Boxen und stimuliert so die transkriptionelle Aktivität von Genen, die Zellwachstum, Zellzyklus, Metabolismus, Proteinbiosynthese und Ribosomenbiogenese stimulieren. Zudem reprimiert das Myc:Max-Heterodimer über Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie z.B. Miz1 (*Myc interacting Zinc finger protein 1*) Gene, die für Zellzyklusarrest, Zelladhäsion und Zell-Zell-Kommunikation verantwortlich sind (angelehnt an (Eilers and Eisenman, 2008) und Susanne Walz, persönliche Mitteilung).

Myc bindet an 10 – 15% der Gen-Loki in Säugerzellen (Dang et al., 2006; Zeller et al., 2006). Die DNA-Bindung erfolgt durch Rekrutierung von Kofaktoren und wird von Modifikationen der DNA und der Histone beeinflusst. So verhindert z.B. die DNA-Methylierung in E-Box-Bereichen teilweise die Myc-DNA-Bindung (Guccione et al., 2006; Perini et al., 2005). Histonmodifikationen wie H3-K4 oder H3-K79-Methylierung, die auf aktives Chromatin hinweisen, sind bevorzugte Bereiche für die Myc-Bindung (Guccione et al., 2006).

Die meisten aktivierten Myc-Zielgene werden von der RNA-Polymerase II transkribiert, welche für die Transkription der mRNAs und der Mehrzahl der microRNAs verantwortlich ist. Neuere Studien belegen aber, dass Myc auch Gene induziert, die durch die RNA-Polymerase III transkribiert werden, z.B. tRNAs und 5S ribosomale RNA (Gomez-Roman et al., 2003; Steiger et al., 2008). Auch durch RNA-Polymerase I transkribierte ribosomale RNAs gehören zu den Myc-Zielgenen (Arabi et al., 2005; Grandori et al., 2005). Myc-Zielgene lassen sich in mehrere funktionelle Gruppen einteilen. Die aktivierten Gene sind vor allem involviert in Zellwachstum, Zellzyklus, Metabolismus, Proteinbiosynthese und Ribosomenbiogenese. Die reprimierten Gene hingegen spielen eine Rolle für Zellzyklusarrest, Zelladhäsion und Zell-Zell-Kommunikation (Übersichtsartikel: (Eilers and Eisenman, 2008)) (Abb. 2). Durch diese differenzielle Regulation der Zielgene induziert Myc beispielsweise Transformation (Stone et al., 1987) und Proliferation (Conzen et al., 2000), die zur Tumorentstehung führen können. Die Zelle besitzt jedoch Schutzmechanismen gegen unkontrolliertes, Myc-induziertes Wachstum. Hierzu zählt z.B. die Induktion von Apoptose, vor allem bei stark erhöhter Myc-Überexpression (Evan et al., 1992; Murphy et al., 2008).

1.1.2.2 Transkriptionsunabhängige Funktionen von Myc

Die Charakterisierung von verschiedenen Deletionsmutanten weist darauf hin, dass Myc auch transkriptionsunabhängige Funktionen besitzen könnte. Die Myc-Mutante, bei der die Myc-Box IV deletiert wurde und die in der DNA-Bindung geschwächt ist, reduziert weder die Myc-induzierte Proliferation noch die Transformation (Cowling et al., 2006). Myc erhöht zudem unter anderem die Translation spezifischer mRNAs, indem es durch Rekrutierung des Transkriptionsfaktors II H (TFIIH) die Methylierung der 5'-Kappe von mRNAs, wie z.B. CDK9 (*cyclin dependent kinase 9*) und Cyclin T1 (Cowling and Cole,

2007) oder auch EIF4A1 und EIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4A1* bzw. *4E*) (Cole and Cowling, 2009) vermittelt.

Myc beeinflusst die DNA-Replikation, indem es mit mehreren Komponenten des prä-replikativen Komplexes interagiert oder diesen an DNA-Replikationsstartstellen rekrutiert (Dominguez-Sola et al., 2007). Auch über die Dissoziation des Komplexes aus Miz1 und TopBP1 (*topoisomerase (DNA) II binding protein 1*), was zum Abbau von TopBP1 führt, verhindert Myc eine Blockade der Replikation (Herold et al., 2008).

Zusätzlich wurde beschrieben, dass ein durch Calpain-Spaltung verkürztes Myc-Protein (Myc-nick) die Zelldifferenzierung reguliert. Myc-nick besitzt weder die nukleären Lokalisationssignale noch kann es mit Max interagieren oder DNA binden. Myc-nick ist cytoplasmatisch lokalisiert und führt über die Myoblastenfusion zur Muskeldifferenzierung (Conacci-Sorrell et al., 2010).

1.1.3 Deregulation von Myc in Tumoren

Die drei humanen Myc-Onkoproteine Myc, N-Myc und L-Myc sind in etwa 70% aller humanen Tumoren überexprimiert (Nilsson and Cleveland, 2003). Dabei ist das *MYC*-Gen selbst selten mutiert, sondern meist sind transkriptionelle oder post-transkriptionelle Mechanismen der Myc-Regulation verändert, die im Folgenden näher beschrieben werden.

1.1.3.1 Chromosomale Translokation

Bereits kurz nach der Identifikation des zellulären *MYC*-Gens wurden mehrere Translokationen beschrieben, die zu verschiedenen Neoplasien führen. Dabei wird das *MYC*-Gen unter die Kontrolle eines aktiven Promotors oder *Enhancers* transloziert, der endogenen Transkriptionskontrolle entzogen und somit überexprimiert. Im murinen Plasmazytom wurde eine Translokation von Myc in den Locus der schweren Immunglobulinkette beschrieben (Crews et al., 1982; Shen-Ong et al., 1982). In 80% der humanen Burkitt-Lymphome, einem B-Zell-Tumor, ist das *MYC*-Gen ebenfalls in den Locus der schweren Immunglobulinkette transloziert (Boxer and Dang, 2001; Taub et al., 1982). Die Translokation von *MYC* in den Locus des T-Zell-Rezeptors spielt eine Rolle bei der Entstehung von T-Zell-Leukämien (Erikson et al., 1986; Finger et al., 1988).

1.1.3.2 Amplifikation

Eine Genamplifikation, bei der in der Zelle mehr als zwei, teilweise bis über 100 Genkopien vorliegen, wurde für Myc in Zelllinien von mehreren Tumor-Arten, wie z.B. im Kolonkarzinom (Alitalo et al., 1983) oder bei der promyelozytischen Leukämie (Dalla-Favera et al., 1982) beschrieben. N-Myc ist im Neuroblastom amplifiziert und korreliert mit einer schlechten Prognose (Brodeur et al., 1984; Schwab et al., 1984). L-Myc führt bei Amplifikation zur Entstehung des kleinzelligen Bronchial-karzinoms (Nau et al., 1985) und des Ovarialkarzinoms (Wu et al., 2003), wobei auch hier die Amplifikation mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert.

1.1.3.3 Transkriptionelle Myc-Regulation

In adulten Zellen ist sowohl die Myc-Protein- als auch die *MYC*-mRNA-Expression relativ gering (Marcu et al., 1992; Oster et al., 2002). In quieszenten Zellen wird durch mitogene Stimulation bereits innerhalb von wenigen Stunden die *MYC*-mRNA und der Wiedereintritt in den Zellzyklus induziert (Kelly et al., 1983). In proliferierenden Zellen ändert sich jedoch weder die Myc-Protein- noch die *MYC*-mRNA-Expression in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen (Hann et al., 1985; Thompson et al., 1985). Durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder Differenzierung von Zellen verringert sich die Myc-Expression. Im adulten Gewebe beschränkt sich die Myc-Expression im Wesentlichen auf Zellen mit regenerativem und proliferativem Potential, wie z.B. Stammzellen oder hochproliferative Zellen in Kolonkrypten (Übersichtsartikel: (Wierstra and Alves, 2008)).

Das humane *MYC*-Gen besitzt vier Promotoren: P0, P1, P2 und P3, von denen in gesunden Zellen nur die beiden Promotoren P1 und P2 genutzt werden. Aufgrund einer perfekten TATA-Box innerhalb des P2-Promotors initiiert dieser 75 – 90%, P1 hingegen nur 10 – 25% der *MYC*-mRNA-Transkripte (Wierstra and Alves, 2008).

Die transkriptionelle Kontrolle der *MYC*-Expression ist sehr komplex und beinhaltet sowohl Mechanismen der Transkriptionsinitiation als auch der -elongation. Bei der Differenzierung beispielsweise verringert sich erst die transkriptionelle Elongation, bevor anschließend die Transkriptionsinitiation verlangsamt und anschließend völlig blockiert wird (Siebenlist et al., 1988).

Mehr als 20 Transkriptionsfaktoren sind bekannt, die den *MYC*-Promotor regulieren (Übersichtsartikel: (Wierstra and Alves, 2008)). Einige sind in Tumoren aktiviert oder

überexprimiert und erhöhen somit die *MYC*-Expression. Ets-1 (*v-ets avian erythroblastosis virus E2 oncogene homolog 1*) und E2F1 beispielsweise, die durch MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases*) und CDKs (*cyclin dependent kinases*) reguliert werden, induzieren die *MYC*-Expression (Roussel et al., 1994). Auch eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges steigert die *MYC*-Expression (He et al., 1998; van de Wetering et al., 2002). Diese Regulation ist entscheidend für die Entstehung von kolorektalen Tumoren. Die *MYC*-Expression kann auch reprimiert werden, z.B. durch einen aus Smad und E2F4 bestehenden Repressorkomplex, der die *MYC*-mRNA-Mengen nach TGF β (*transforming growth factor, beta*)-Stimulation vermindert (Chen et al., 2002; Hu and Rosenblum, 2005). C/EBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) interferiert mit der E2F1-Transaktivierung am *MYC*-Promotor und reprimiert somit ebenfalls die *MYC*-Transkription (Iakova et al., 2003; Johansen et al., 2001).

Die Myc-Regulation erfolgt aber nicht nur durch exogene Stimuli. Über Rückkopplungsmechanismen kontrolliert Myc seine Expression unter anderem durch Reprimierung der Transkriptionsinitiation des eigenen Promotors (Penn et al., 1990). Eine Blockade dieser Autosuppression trägt zur Transformation von Zellen und zur Entstehung von Tumoren bei (Facchini et al., 1994).

1.1.3.4 mRNA-Stabilität

Die *MYC*-mRNA-Menge wird transkriptionsunabhängig durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert. Zum einen reduziert die Kürzung und Abspaltung des Poly-A-Überhanges der *MYC*-mRNA deren Stabilität (Brewer and Ross, 1988; Jones and Cole, 1987). Das Fehlen des Poly-A-Überhanges führt zum raschen zytoplasmatischen Abbau der *MYC*-mRNA und somit zur reduzierten *MYC*-Translation. Zum anderen wird die *MYC*-mRNA stabilisiert, indem das Protein CRD-BP (*coding region determinant-binding protein*) an den C-terminalen Bereich der kodierenden Sequenz der Polysomen-assoziierten *MYC*-mRNA bindet und so den Endonuklease-Verdau verhindert (Bernstein et al., 1992). CRD-BP wurde initial bei der embryonalen Leberentwicklung beschrieben (Leeds et al., 1997). Mittlerweile ist bekannt, dass CRD-BP unter anderem im Kolonkarzinom (Noubissi et al., 2006), im Mammakarzinom (Doyle et al., 2000) und in mesenchymalen Tumoren (Ioannidis et al., 2001) überexprimiert ist und somit zur Stabilisierung der *MYC*-mRNA und zur erhöhten Myc-Expression führt.

1.1.3.5 Translationskontrolle

Die Translation von mRNAs erfolgt in vier Schritten: Initiation, Elongation, Termination und Regeneration der Ribosomen. Translationsregulation erfolgt dabei vor allem bei der Initiation. Eukaryotische Initiationsfaktoren (eIFs) binden an die methylierte 5'-Kappe der mRNA oder an den Poly-A-Überhang am 3'-UTR (untranslatierte Region) und initiieren die Translation. Die Initiation kann auch über IRES (*internal ribosome entry sites*) reguliert werden. Weiterhin assoziieren RNA-bindende Proteine oder auch miRNAs mit der mRNA, blockieren die Funktion von eIFs und verringern somit die Translation (Übersichtsartikel: (Sonenberg and Hinnebusch, 2009)). Diese verschiedenen Mechanismen wurden auch für die Regulation der *MYC*-Translation beschrieben.

Innerhalb des 5'-UTRs der *MYC*-mRNA befindet sich eine IRES (Stoneley et al., 1998), die die *MYC*-Translation erhöht. Dies trifft nur auf die *MYC*-mRNA-Transkripte zu, die von den Promotoren P0, P1 und P2 transkribiert werden. Die Überexpression von eIF4E stimuliert die *MYC*-Translation. Die *MYC*-Translation wird zudem über die 5'-Kappe reguliert, da die Überexpression von eIF4E in Zellen die Translation stimuliert (Carter et al., 1999). Im multiplen Myelom konnte gezeigt werden, dass aufgrund einer Mutation im 5'-UTR die *MYC*-mRNA-Beladung der Polysomen erhöht und so die Translation gesteigert ist (Paulin et al., 1996).

Auch über das 3'-UTR wird die *MYC*-Translation reguliert. Polyamine stimulieren die Assoziation des RNA-bindenden Proteins HuR (*Hu antigen R*) an das 3'-UTR von *MYC*, wodurch sich die Translationsrate erhöht (Liu et al., 2009). Zusätzlich wurden mehrere microRNAs (miRNAs) beschrieben, die *MYC* über das 3'-UTR reprimieren: miR-34 (Cannell et al., 2010; He et al., 2007; Kong et al., 2008), miR-145 (Sachdeva et al., 2009) sowie let-7 (Akao et al., 2006; Sampson et al., 2007). Involviert in mehrere Aspekte der Tumorentstehung ist dabei die miR-34-Familie (Übersichtsartikel: (Hermeking, 2010)). Sie besteht aus drei Familienmitgliedern: miR-34a, miR-34b und miR-34c. miR-34a wird von einem eigenen Promotor reguliert, während miR-34b und miR-34c durch dieselbe pre-miRNA BC021736 exprimiert werden (He et al., 2007). p53 induziert die Expression aller drei Familienmitglieder (He et al., 2007), während ELK1 (*ETS-like gene 1*) spezifisch miR-34a reguliert (Christoffersen et al., 2010). Die Deregulation von microRNAs spielt auch bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle. Die Expression von miR-34-Familienmitgliedern ist beispielsweise im Kolonkarzinom (Toyota et al., 2008), im Neuroblastom (Wei et al., 2008) oder im Pankreaskarzinom (Chang et al., 2007a) im

Vergleich zu gesundem Gewebe verringert, wodurch sich die Myc-Proteinexpression erhöht.

1.1.3.6 Regulation der Proteinstabilität

Das Myc-Protein besitzt in normalen Zellen eine sehr kurze Halbwertszeit von nur 20 bis 30 Minuten (Hann and Eisenman, 1984; Ramsay et al., 1984). In Tumorzellen ist die Halbwertszeit häufig verlängert. Der Myc-Abbau wird dabei vor allem über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung reguliert (Übersichtsartikel: (Vervoorts et al., 2006)). Der am besten charakterisierte Mechanismus involviert die Phosphorylierungsstellen Threonin 58 (T58) und Serin 62 (S62) innerhalb der Myc-Box I. Die Phosphorylierung von S62 erfolgt durch verschiedene Prolin-abhängige Kinasen. Der Ras-Signalweg beispielsweise stimuliert über MAP-Kinasen die Phosphorylierung von S62 (Sears et al., 1999; Sears et al., 2000). Sobald S62 phosphoryliert ist, wird T58 zu einem Substrat für die Kinase GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 beta*) (Lutterbach and Hann, 1994; Sears et al., 2000). Das doppelt phosphorylierte Myc-Protein wird durch die Prolylisomerase PIN1 (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, NIMA-interacting 1*) erkannt, die die Struktur von Myc ändert und es der Proteinphosphatase PP2A ermöglicht, Myc an S62 zu dephosphorylieren (Yeh et al., 2004). T58-phosphoryliertes Myc wird durch das F-Box Protein FBXW7 (*F-box and WD repeat domain containing 7*) erkannt, polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Welcker et al., 2004a; Welcker et al., 2004b; Yada et al., 2004). Die Ubiquitin-spezifische Protease USP28 antagonisiert den FBXW7-vermittelten Myc-Abbau, indem sie über FBXW7 an das Myc-Protein bindet, es deubiquitiniert und somit zur Stabilisierung von Myc führt (Popov et al., 2007). Der Myc-Abbau durch Phosphorylierung von T58 spielt auch in Tumoren eine große Rolle. Obwohl für das Myc-Protein kaum Mutationen beschrieben sind, sind es genau T58 und S62, die in 80% der Burkitt-Lymphome mutiert sind und somit zur Proteinstabilisierung führen (Bahram et al., 2000; Bhatia et al., 1993; Yano et al., 1993).

Neben FBXW7 gibt es noch weitere Ubiquitinligasen, die die Myc-Protein-Halbwertszeit regulieren. Unabhängig von der Phosphorylierung an T58 oder S62 erfolgt eine Ubiquitinierung von Myc durch Skp2 (Kim et al., 2003; von der Lehr et al., 2003). β -TrCP (*beta-transducin repeat containing protein*) führt nach Phosphorylierung durch die Kinase

PLK1 (*polo-like kinase 1*) zur heterotypischen Ubiquitinierung von Myc, was zu dessen Stabilisierung führt (Popov et al., 2010). Auch für die Ligase TRUSS (*tumor necrosis factor receptor-associated ubiquitous scaffolding and signaling protein*) wurde postuliert, dass es die Ubiquitinierung von Myc am C-Terminus katalysiert und so dessen Abbau induziert (Choi et al., 2010). Diese TRUSS-vermittelte Myc-Ubiquitinierung reguliert sowohl Myc als auch N-Myc. Die Kinase Aurora-A hingegen stabilisiert spezifisch N-Myc, indem sie sowohl mit N-Myc als auch mit FBXW7 interagiert und vor dem proteasomalen Abbau schützt (Otto et al., 2009).

1.1.4 Die Rolle von Myc in Tumoren

Myc ist involviert in eine Vielzahl von biologischen Prozessen, die die Tumorentstehung fördern. Wie bereits beschrieben, aktiviert Myc Proliferation, Zellwachstum, Metabolismus und Translation. Durch Myc reprimierte Gene beinhalten Zellzyklusinhibitoren, was wiederum zum beschleunigten Zellzyklus und zur erhöhten Proliferation führt. In vielen verschiedenen Mausmodellen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Myc-Expression und Tumorentstehung nachgewiesen werden. Die Überexpression von Myc führt beispielsweise zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen (Adams et al., 1985), Mammakarzinomen (Schoenenberger et al., 1988) oder auch Pankreaskarzinomen (Pelengaris et al., 2002).

Myc ist nicht nur für die Tumorentstehung wichtig, sondern auch für die Aufrechterhaltung und das Wachstum von Tumoren. Die Inaktivierung von Myc in etablierten Tumoren kann zur Tumorregression führen. Mit Hilfe eines Tetrazyklin-regulierbaren *MYC*-Konstruktes konnte im Mausmodell abhängig von der Art des Gewebes eine teilweise oder vollständige Regression der Tumoren durch Induktion von Apoptose, Seneszenz oder Differenzierung nach Myc-Inaktivierung erreicht werden (Abb. 3). Dies wurde für B- und T-Zelllymphome (Felsher and Bishop, 1999; Karlsson et al., 2003; Marinkovic et al., 2004), hepatozelluläre Karzinome (Shachaf et al., 2004), Osteosarkome (Jain et al., 2002) sowie Pankreaskarzinome und Papillome (Pelengaris et al., 2004) gezeigt. Während eine erneute Induktion von Myc beim hepatozellulären Karzinom (Shachaf et al., 2004) oder beim Pankreaskarziom zu einem Wiederauftritt von Tumoren führt, resultiert die Myc-

Reaktivierung in Knochenzellen in Apoptose (Jain et al., 2002). Dies zeigt, dass auch die Reaktivierung von Myc nach Tumorregression gewebsspezifische Phänotypen erzeugt.

Ähnliche Effekte wie mit der Tetrazyklin-abhängigen Inaktivierung von Myc wurden auch bei der Verwendung eines dominant-negativen Myc-Konstruktes (Omomyc) erzielt. Bei Omomyc handelt es sich um eine mutante Form der BR-HLH-LZ-Domäne von Myc, die die Aktivierung von Myc-Zielgenen verhindert, während die Repression funktional unverändert bleibt. Eine Inaktivierung von Myc mit Hilfe dieses Omomyc-Konstruktes führt z.B. zur Regression von etablierten Lungenkarzinomen (Soucek et al., 2008).

Durch beide Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von Myc in Tumoren therapeutisch vielversprechend ist. Im Gegensatz zu Enzymen wie Kinasen bietet Myc kein aktives Zentrum, das Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika sein könnte. Daher untersuchen viele Studien zur Identifikation von neuen Therapie-Möglichkeiten für Myc-abhängige Tumoren die Signalwege und Proteine, die das Myc-Molekül stabilisieren oder destabilisieren. So geht man davon aus, dass auch die Inhibition von Myc-stabilisierenden Mechanismen bzw. die Aktivierung von Myc-destabilisierenden Mechanismen zur Reduktion der Myc-Proteinexpression und somit zur Regression humaner Tumoren führt.

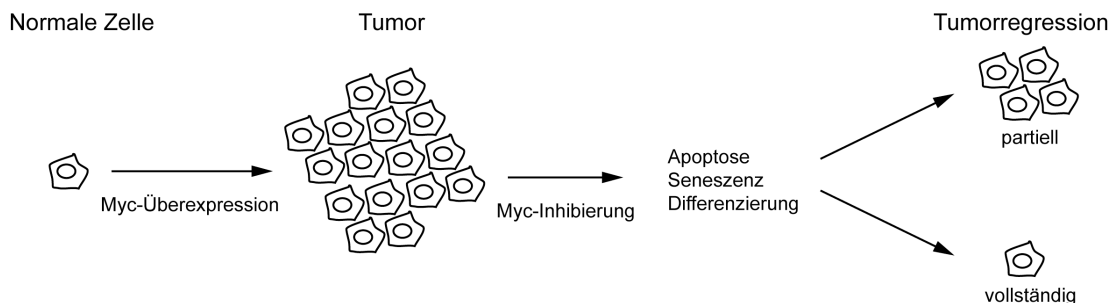


Abb. 3: Myc stimuliert sowohl die Tumorentstehung als auch das Tumorwachstum.

Überexpression von Myc führt in vielen Organen durch erhöhte Proliferation und Transformation zur Entstehung von Tumoren. Eine Inhibierung von Myc in etablierten Tumoren führt je nach Art des Gewebes zur Induktion von Apoptose, Seneszenz oder Differenzierung und resultiert somit in partieller oder vollständiger Tumorregression.

1.2 Hochdurchsatzanalyse mittels RNA-Interferenz

Zur Entwicklung neuer Therapieansätze von Myc-induzierten Tumoren sollten im Rahmen dieser Arbeit neue Regulationswege der post-transkriptionellen Myc-Expression identifiziert und analysiert werden. Hierfür wurde ein Hochdurchsatzverfahren auf der Basis der RNA-Interferenz etabliert, durchgeführt, validiert und analysiert.

1.2.1 RNA-Interferenz

Der Begriff der RNA-Interferenz (RNAi) wurde erstmals im Nematodenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als sequenzspezifisches Abschalten von Genen in Antwort auf doppelsträngige RNA (dsRNA) beschrieben (Fire et al., 1998; Tabara et al., 1998). Bereits zuvor wurde der Begriff der *Antisense*-RNA bzw. der *Antisense*-vermittelten Stilllegung von Genen geprägt (Guo and Kemphues, 1995; Izant and Weintraub, 1984). Hierbei wurden einzelsträngige, der Ziel-mRNA komplementäre RNA-Moleküle in die Zelle eingebracht. Allerdings erfolgte die Gendepletion durch doppelsträngige RNA 10 bis 100-fach effektiver als durch die jeweiligen einzelnen RNA-Stränge (Fire et al., 1998). Die RNAi ist nicht nur auf *C. elegans* beschränkt, sondern sie ist auch in Pflanzen (de Carvalho et al., 1992; Hamilton and Baulcombe, 1999), Pilzen (Catalanotto et al., 2000), bei *Drosophila melanogaster* (Aravin et al., 2001; Kennerdell and Carthew, 1998) und bei Säugetieren (Wianny and Zernicka-Goetz, 2000) konserviert.

Für den genauen Wirkmechanismus gibt es mehrere mögliche Hypothesen. Doppelsträngige RNA kann Gene durch Promotor-Methylierung stilllegen (Mette et al., 2000; Wassenegger et al., 1994). Die RNAi-Maschinerie ändert zudem die Chromatinstruktur, indem aktives Euchromatin in hochkondensiertes, inaktives Heterochromatin umgewandelt wird (Gonzalez et al., 2008). Der am besten charakterisierte Mechanismus erfolgt durch post-transkriptionelle Genregulation (Fire et al., 1998) (Abb. 4).

Bei Untersuchungen der Mechanismen und Funktionen der RNAi wurden die doppelsträngigen RNA-Moleküle exogen in Zellen oder ganze Organismen eingebracht. *Antisense*-RNAs wurden auch endogen in den Zellen beschrieben (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000). Diese ca. 20 Nukleotide kurzen RNA-Moleküle nennt man microRNAs (miRNAs) (Abb. 4). Durch Transkription eines miRNA-Gens mit Hilfe der

RNA Polymerase II (Pol II) entsteht die haarnadelförmige Pri-miRNA, die durch das Enzym Drosha zu Pre-miRNA prozessiert wird (Lee et al., 2003). Diese Pre-miRNA wird mit Hilfe des Proteins Exportin 5 ins Zytoplasma transloziert (Yi et al., 2003) und dort durch die Endoribonuklease Dicer in einen miRNA:miRNA Duplex geschnitten (Bernstein et al., 2001; Macrae et al., 2006). Sehr ähnlich verläuft die Expression und Prozessierung der exogenen shRNAs (*short hairpin RNAs*). shRNAs werden durch die RNA Polymerase III (Pol III) transkribiert, ebenfalls von Drosha prozessiert und mit Hilfe des Proteins Exportin 5 ins Zytoplasma exportiert. Auch diese exogene doppelsträngige RNA wird von Dicer in 20 – 25 Nukleotide kurze Moleküle geschnitten (Abb. 4).

Die kurzen dsRNA-Moleküle werden miRNA (microRNA) bzw. siRNA (*small interfering RNA*) genannt, je nachdem, ob sie endogen generiert oder exogen durch Transfektion oder Infektion in die Zellen eingebracht wurden. Sowohl der RNA-Duplex der miRNA als auch der der siRNA besteht jeweils aus einem *Sense*- und einem *Antisense*-Strang und wird von der katalytischen Komponente des RISC-Komplexes (*RNA-induced silencing complex*), dem Argonaut-Protein, erkannt (Hammond et al., 2001). Mit Hilfe des RISC-Komplexes findet die Basenpaarung an die Ziel-mRNA statt. Im Folgenden unterscheiden sich die miRNAs von den siRNAs. miRNAs besitzen meist keine perfekte Basenpaarung mit dem 3'-UTR der Ziel-mRNA. Hierdurch wird vorwiegend die Translation der mRNA blockiert, ohne zum Abbau der mRNA zu führen (Gu and Kay, 2010). siRNAs hingegen werden so entworfen, dass eine perfekte Basenpaarung mit der Ziel-mRNA vorliegt. Hierdurch wird die Ziel-mRNA in kleinere Fragmente geschnitten und anschließend abgebaut (Zamore et al., 2000). In einzelnen Fällen führen auch miRNAs mit perfekter oder nahezu perfekter Komplementarität zum Abbau der Ziel-mRNA (Doench et al., 2003; Hutvagner and Zamore, 2002).

1.2.2 RNA-Interferenz-Bibliotheken

Die RNA-Interferenz hat sich in den vergangenen Jahren zu einem Werkzeug für das gezielte Ausschalten von einzelnen Genen entwickelt und wird von vielen Arbeitsgruppen in Form von RNAi-Bibliotheken in Hochdurchsatzverfahren angewendet. Man unterscheidet dabei vektorbasierte shRNA-Bibliotheken von siRNA-Bibliotheken, die aus kurzen synthetischen Oligonukleotiden bestehen.

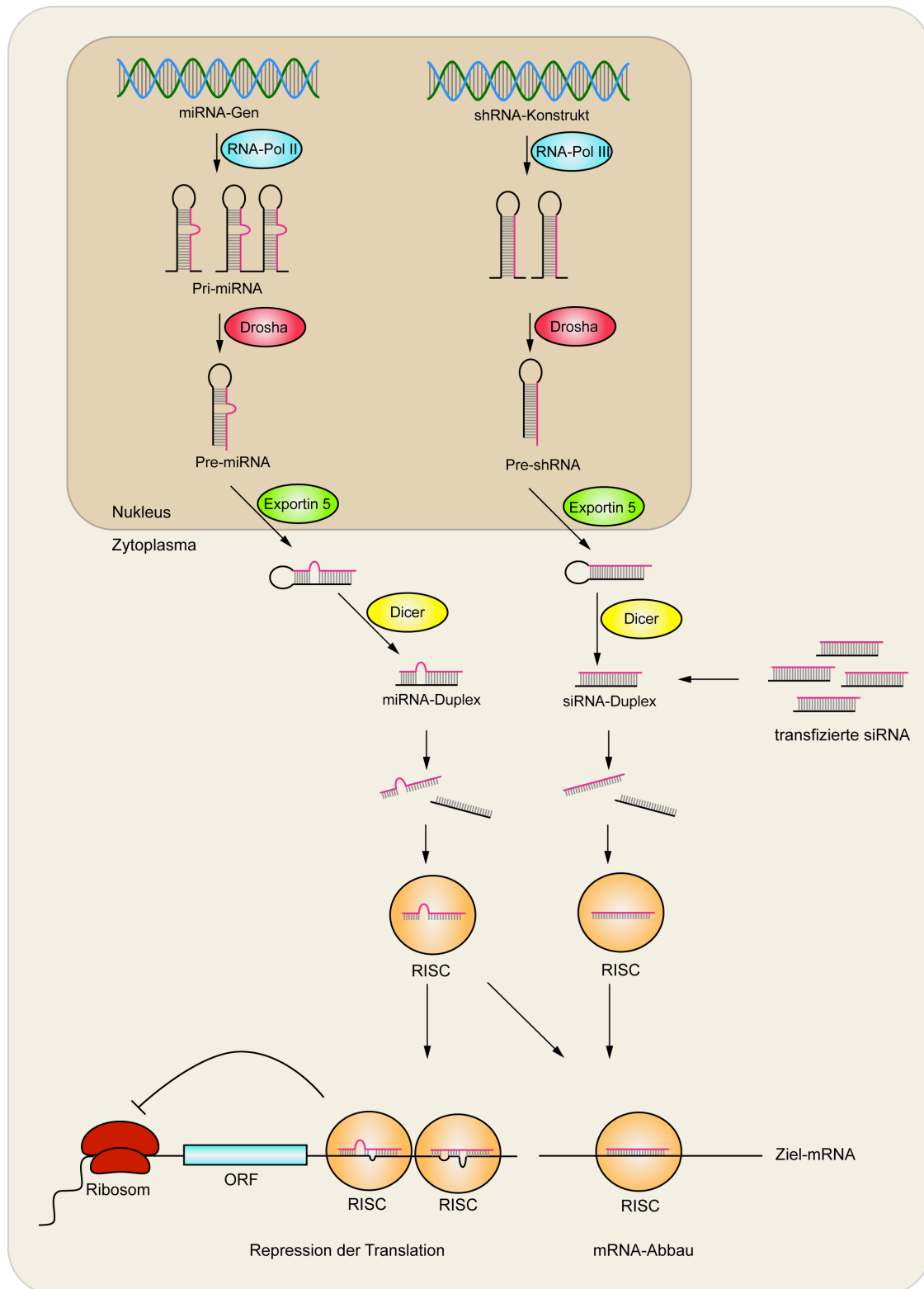


Abb. 4: Prozessierung und Wirkmechanismen von miRNAs, shRNAs und siRNAs.

Endogene microRNAs bzw. exogen in die Zelle eingebrachte shRNAs werden durch RNA-Polymerase II bzw. III transkribiert, von Drosha prozessiert und mit Hilfe von Exportin 5 ins Zytoplasma transloziert. Dort werden sie von Dicer in 20 bis 25 Nukleotide kurze doppelsträngige Moleküle geschnitten. Diese prozessierten miRNAs bzw. shRNAs werden ebenso wie transfizierte siRNAs in den RISC (*RNA-induced silencing complex*)-Komplex aufgenommen und binden an die Ziel-mRNA. Liegt wie bei miRNAs eine nicht-perfekte Basenpaarung mit der mRNA vor, wird die Translation blockiert. Die perfekte Komplementarität der siRNAs führt zum Abbau der Ziel-mRNA (angelehnt an (He and Hannon, 2004)).

1.2.2.1 shRNA-Bibliotheken

Die beiden ersten verfügbaren shRNA-Bibliotheken wurden am Nederlands Kanker Instituut (NKI, Amsterdam) (Brummelkamp et al., 2002) bzw. in den Cold Spring Harbor Laboratories (CSHL, New York) (Paddison et al., 2004) entwickelt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Bibliothek vom NKI werden die shRNAs vom Vektor pRETRO.SUPER kodiert, der eine retrovirale Infektion der Zielzellen ermöglicht (Brummelkamp et al., 2002). Für die Depletion der Zielgene liegt jeweils ein Gemisch aus drei verschiedenen Sequenzen vor. Durch die im Vektor vorhandene Puromycin-Resistenzkassette lassen sich die Zielzellen selektionieren, wodurch nur erfolgreich infizierte Zellen für die weitere Analyse verwendet werden (Bernards et al., 2006). Einen weiteren Vorteil der shRNA-Infektion stellt die stabile Integration ins Genom dar. Hierdurch ist es möglich, die Zielgene in den Zellen über mehrere Tage oder Wochen zu depletieren, ohne dass sich die Depletionseffizienz verringert.

1.2.2.2 siRNA-Bibliotheken

Bei siRNAs handelt es sich um 19 Nukleotide kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle mit einem 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende. Diese Oligonukleotide werden synthetisch hergestellt und durch transiente Transfektion in die Zielzellen eingebracht. siRNA-Bibliotheken sind kommerziell von mehreren Firmen erhältlich, wie z.B. Dharmacon/ThermoFisher Scientific, Ambion oder Qiagen.

Die hier verwendete siRNA-Bibliothek von Dharmacon/ThermoFisher Scientific enthält jeweils vier Sequenzen gegen jedes Gen. Durch diese sogenannte *Smartpool* Technologie soll das Auftreten von sequenzunspezifischen Nebeneffekten minimiert werden, da die Konzentration einer jeden siRNA bei gleichbleibender Gesamtkonzentration auf 25% vermindert ist. Im Vergleich zu shRNA-Bibliotheken lässt sich mit siRNA nur eine transiente Depletion der Ziel-mRNA erreichen. Auch werden in der zellulären Analyse nicht-transfizierte Zellen gemessen, da ein Selektionsmarker fehlt. Meist ist die Depletionseffizienz höher als bei shRNA-vermittelter Gendepletion.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In 70% der humanen Tumoren findet sich eine Überexpression eines der drei Mitglieder der Myc-Onkoproteinfamilie. Die Myc-Onkoproteine spielen eine essentielle Rolle für die Entstehung und das Wachstum von Tumoren. Wird Myc in etablierten Tumoren inhibiert, führt das zu einer teilweisen oder vollständigen Regression. Dies macht Myc zu einem vielversprechenden therapeutischen Zielprotein in Tumoren. Das Myc-Protein selbst kann bislang nicht therapeutisch gehemmt werden, da es – anders als Enzyme – kein aktives Zentrum besitzt. Jedoch sind bei der Myc-Überexpression in Tumoren häufig Mechanismen der post-transkriptionellen Regulation verändert. Die Identifikation und Analyse der daran beteiligten Signalwege ergibt neue Interventionsmöglichkeiten für die Tumorthherapie.

Daher sollten in dieser Doktorarbeit neue Signalwege identifiziert werden, die die Myc-Proteinexpression post-transkriptionell regulieren. Dazu sollte ein Immunfluoreszenz-basiertes Hochdurchsatzverfahren entwickelt und durchgeführt werden. Aufgrund der entscheidenden Rolle bei der Regulation der post-transkriptionellen Proteinexpression konzentrierten wir uns im Rahmen dieser Doktorarbeit auf die Rolle von Kinasen bei der Myc-Regulation. Hierfür standen zwei verschiedene RNA-Interferenz-Bibliotheken zur Verfügung, die jeweils das gesamte Kinom als Zielgene hatten. Dabei handelte es sich zum einen um eine shRNA-Bibliothek (Bernards et al., 2006), zum anderen um eine kommerziell erhältliche siRNA-Bibliothek. Nach Etablierung, Durchführung und Validierung der Hochdurchsatzanalyse sollte eines der identifizierten Zielgene genauer analysiert und der Mechanismus der post-transkriptionellen Myc-Regulation bestimmt werden. Zudem sollte die biologische Relevanz der neu identifizierten Myc-Regulation in der Tumorentstehung bzw. des Tumorwachstums bestimmt werden.

2 Materialien

2.1 Bakterienstämme und Zelllinien

2.1.1 Bakterienstämme

- DH5α *Escherichia coli*; chromosomaler Genotyp: F⁻, ϕ 80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*; verwendet zur Herstellung und Amplifikation von DNA-Plasmiden
- BL21 *Escherichia coli*; chromosomaler Genotyp: B, F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(r_B⁻m_B⁻), gal [malB⁺]_{K-12}(λ^S); verwendet zur Expression von GST-Fusionsproteinen

2.1.2 Zelllinien

- Caco-2 humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
- HCT116 humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC), entweder als Wildtyp (p53^{+/+}) oder mit *Trp53*-Defizienz (p53^{-/-}) (Bunz et al., 1998)
- HEK293 humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC)
- HeLa humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC)
- HT-29 humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
- Ls174T humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC)
- MCF10A humane Brustepithelzelllinie (ATCC)
- PHX humane Verpackungszelllinie (Phoenix-Eco) zur Herstellung von MoMuLV-Retroviren; sie stammt von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 ab (Kinsella and Nolan, 1996)
- U2OS humane Osteosarkomzelllinie (ATCC)

Die hier aufgeführten Zelllinien wurden gegebenenfalls mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Resistenzgen (Neomycin bzw. Hygromycin) transfiziert, um sie zur stabilen Proteinexpression infizieren zu können.

2.2 Kultivierungsmedien und Zusätze

2.2.1 Medien und Antibiotika zur Bakterienkultivierung

Medien

LB-Medium	1% (w/v) Baktotrypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 1,2% (w/v) Bakto-Agar; nach Erhitzen wurde der LB-Agar auf 50°C abgekühlt und 20 ml auf eine 10 cm-Schale gegossen

Antibiotika

Je nach Resistenzgen des verwendeten DNA-Plasmids wurden dem LB-Medium oder dem LB-Agar folgende Antibiotika hinzugefügt.

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml

2.2.2 Medien und Zusätze für die Säugerzellkultivierung

Medien:

Für die Kultivierung der humanen Zelllinien wurden DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Lonza) und RPMI-1640 (Lonza) Medien verwendet, die bereits mit L-Glutamin (DMEM: 4 mM; RPMI-1640: 2,1 mM) und gegebenenfalls Glukose (DMEM: 4,5 g/l) supplementiert waren. Für die Bestimmung der *MYC*-Translationrate wurde Methionin-freies DMEM-Medium (Sigma) eingesetzt. Dem Medium zugesetztes fötales Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS; Sigma) wurde vor Verwendung hitzeinaktiviert (30 min, 56°C).

HT-29, Ls174T	RPMI-1640 10% (v/v) FBS 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml)
Caco-2, HCT116, HeLa, PHX, U2OS	DMEM 10% (v/v) FBS 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml)

MCF10A	DMEM/F12 5% (v/v) Pferdeserum 20 ng/ml EGF 0,5 mg/ml Hydrocortison 100 ng/ml Cholera toxin 10 µg/ml Insulin 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml)
Einfriermedium	95% (v/v) FBS 5% (v/v) DMSO
Hungermedium	DMEM bzw. RPMI-1640 (abhängig von der Zelllinie) 0 bis 0,1% (v/v) FBS (abhängig von der Zelllinie) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml)

Antibiotika

Zur Selektion von erfolgreich transfizierten bzw. infizierten Zellen wurden diese mit folgenden Antibiotika behandelt. Eine Neomycin-Resistenz wurde mit G418 und eine Bleomycin-Resistenz mit Zeocin selektioniert.

G418 (PAA)	800 µg/ml
Puromycin (InvivoGen)	2 µg/ml
Hygromycin (Merck)	100 µg/ml
Zeocin (InvivoGen)	50 - 500 µg/ml

Zur Behandlung von Mycoplasmen-Kontaminationen in der Säugerzellkultivierung wurde gegebenenfalls Plasmocin (InvivoGen) in der Konzentration von 25 µg/ml verwendet. Die Behandlung erfolgte für 2 Wochen mit zweitägigem Wechsel von Medium und Plasmocin. Zur Vorbeugung vor Mycoplasmen-Kontaminationen wurde den Medien der Stockplatten Ciprofloxacin (Sigma) in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben.

Weitere Zusätze

4-Hydroxytamoxifen (Sigma)	200 nM in Ethanol
5-Aza-2'-deoxycytidin (Sigma)	5 bzw. 10 µM in DMSO
Cycloheximid (Sigma)	100 µg/ml in Ethanol
Doxyzyklin (Sigma)	1 µg/ml in Ethanol

NVP-BEZ235 (LC Laboratories)	500 nM in DMSO
SB203580 (Sigma)	25 μ M in DMSO
Trichostatin A (Calbiochem)	80 bzw. 300 nM in DMSO

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 RNAi-Bibliotheken zur Hochdurchsatz-Analyse von Kinasen

shRNA-Bibliothek

Durch ein vektorbasiertes Expressionssystem für eine shRNA (*short hairpin RNA*) konnte eine längerfristige Existenz der interferierenden RNA ermöglicht werden. Der dazu verwendete Vektor pRETRO.SUPER enthält einen RNA-Polymerase III-abhängigen H1-RNA-Promotor. Die transkribierte shRNA wird durch die zellulären Enzyme in eine funktionelle siRNA (*small interfering RNA*) umgewandelt und ermöglicht somit einen dauerhaften Abbau der Ziel-mRNA (Brummelkamp et al., 2002). Der Vektor pRETRO.SUPER ist zudem geeignet, um eine retrovirale Infektion und somit den stabilen Einbau der shRNA in das Genom von Zielzellen zu vermitteln. Erfolgreich infizierte Zellen konnten mittels Puromycin selektioniert werden.

Die in dieser Arbeit verwendete shRNA-Bibliothek wurde am NKI in Amsterdam generiert (Übersichtsartikel: (Bernards et al., 2006)). Insgesamt enthielt diese Bibliothek ca. 600 shRNA-Gemische gegen die humanen Proteinkinasen. Dabei waren je drei unterschiedliche shRNA-Vektoren gegen dieselbe Kinase in einem Gemisch vorhanden, um eine effiziente Depletion zu ermöglichen.

siRNA-Bibliothek

Die siRNA-Bibliothek wurde von der Firma Dharmacon/Thermofisher bezogen und bestand aus etwa 22.000 doppelsträngigen Oligonukleotidgemischen. Sie wurde nach der sogenannten *SMARTpool*-Methode entworfen. Das bedeutet, dass gegen jedes Gen vier verschiedene doppelsträngige RNA-Oligonukleotide in einem Gemisch vorliegen. Für diese Arbeit wurde die Kinase-Subbibliothek bestehend aus ca. 770 Gemischen eingesetzt, wobei jedes Gemisch gegen ein einzelnes Zielgen gerichtet war.

2.3.2 Primer

Alle hier gelisteten humanen DNA-Primer (fwd = *forward*; rev = *reverse*) wurden von den Firmen Invitrogen bzw. Operon synthetisiert. Das Primerdesign erfolgte mit den Programmen Primer3 (für Chromatin-Immunpräzipitation), PrimerX (für Punktmutagenese) oder der Universal ProbeLibrary (Roche; für qRT-PCR; quantitative Reverse Transkriptase-PCR). Bei Oligonukleotiden für die qRT-PCR musste sichergestellt sein, dass sie Exon-Intron-Grenzen überschritten, damit die Amplifikation von genomischer DNA unterblieb. Wurden die Primer verwendet, um Restriktionsschnittstellen an das zu klonierende DNA-Fragment anzufügen, wurden mindestens zwei Basen als 5'-Überhang hinzugefügt, um die Restriktionseffizienz zu erhöhen.

Primer für die Generierung von Expressionsplasmiden

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>FOXO3</i> BamHI (fwd)	CGGGATCCATGGCAGAGGCACCGGCTTCCCCG
<i>FOXO3 HA</i> XhoI (rev)	CCCTCGAGTCAAGCGTAATCTGGTACGTCGTATGGGT AGCCTGGCACCCAGCTCTGAGATGAGGCCTGC
<i>MK5</i> BamHI (fwd)	CCGGATCCATGTCTGGAGGAGAGCGACATGGACAAAG
<i>MK5</i> EcoRI <i>HA</i> XhoI (rev)	CGCCTCGAGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGG TAGAATTCTTGGGATTCGTGGGACGTGGTTTGC
<i>MYC</i> 3'-UTR-EcoRI (rev)	CCGAATTCTGGCTCAATGATATATTTGCCAGTTATTTTA T
<i>MYC</i> BamHI-5'-UTR (fwd)	CCGGATCCACCCCCGAGCTGTGCTGC
<i>MYC</i> BamHI-CDS (fwd)	CCGGATCCATGCCCCCTCAACGTTAGCTTCACC
<i>MYC</i> CDS-EcoRI (rev)	CCGAATTCTTACGCACAAGAGTTCCGTAGCTGTTC

Primer für die zielgerichtete Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>FOXO3</i> S215A (fwd)	CGGCACAACCTGGCACTGCATAGTC
<i>FOXO3</i> S215A (rev)	GACTATGCAGTGCCAGGTTGTGCCG
<i>FOXO3</i> S253A (fwd)	CGGCGGGCTGTCTGCCATGGACAATAG
<i>FOXO3</i> S253A (rev)	CTATTGTCCATGGCGACAGCCCGCCG

<i>FOXO3</i> S551A, S555A (fwd)	GGCAGCCGTGCCTTGGCGAATTCTGTCGCGAACATGG GCTTGAGTG
<i>FOXO3</i> S551A, S555A (rev)	CACTCAAGCCCATGTTTCGCGACAGAATTCGCCAAGGC ACGGCTGCC
<i>MK5</i> K51M (fwd)	GAACGGTTTGCCTGATGATTCTTCTTGATCGTCC
<i>MK5</i> K51M (rev)	GGACGATCAAGAAGAATCATCAGCGCAAACCGTTC
<i>MK5</i> L337G (fwd)	GGCTCACGCGGAACAGGGCGCCAACATGAGAATCC
<i>MK5</i> L337G (rev)	GGATTCTCATGTTGGCGCCCTGTTCCGCGTGAGTG
<i>MK5</i> T182D (fwd)	CCAAGGTGACTTGATGGACCCCCAGTTCACCCC
<i>MK5</i> T182D (rev)	GGGGTGAAGTGGGGGTCCATCAAGTCACCTTGG
si <i>MK5</i> -d-resistant (fwd)	GAAGTATAACCGGGAATGCAAACCTCCTGCGTGACACT CTGCAGAGCTTCA
si <i>MK5</i> -d-resistant (rev)	TGAAGCTCTGCAGAGTGTCACGCAGGAGTTTGCATTC CCGGTTATACTTC

Primer für die quantitative Reverse Transkriptase-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>B2M</i> (fwd)	GTGCTCGCGCTACTCTCTC
<i>B2M</i> (rev)	GTCAACTTCAATGTCGGAT
<i>CCND1</i> (fwd)	GCTGTGCATCTACACCGACA
<i>CCND1</i> (rev)	TTGAGCTTGTTACACCAGGAG
<i>CDKN1A</i> (fwd)	CGATGCCAACCTCCTCAACGA
<i>CDKN1A</i> (rev)	TCGCAGACCTCCAGCATCCA
<i>EFNB1</i> (fwd)	GGAGGCAGACAACACTGTCA
<i>EFNB1</i> (rev)	GAACAATGCCACCTTGGAGT
<i>LGR5</i> (fwd)	AATTTGCGAAGCCTTCAATC
<i>LGR5</i> (rev)	GGGATTTCTGTTAACGCATTG
<i>MK5</i> (fwd)	TCATGACAGGCAGTTTTGAGTT
<i>MK5</i> (rev)	CCGGTTTGACCTTCAGGA
<i>MUC2</i> (fwd)	CAAGATCTTCATGGGGAGGA
<i>MUC2</i> (rev)	GAACACGGTGGTCCTCTTGT

<i>MYC</i> (fwd)	CACCAGCAGCGACTCTGA
<i>MYC</i> (rev)	GATCCAGACTCTGACCTTTTGC
<i>RPS14</i> (fwd)	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA
<i>RPS14</i> (rev)	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC

Primer für die Chromatin-Immunpräzipitation

Bezeichnung des Promotors	Sequenz (5' → 3')
<i>CCND2</i> (fwd)	GAGGGAGGCACTCAGTCG
<i>CCND2</i> (rev)	GCCCTGATGTGCTGGCCAA
miR-34b/c FBS -185 (fwd)	AATCACCAAAAGCCCAGAAA
miR-34b/c FBS -185 (rev)	TTTTAAATGCCCACACAGAGG
miR-34b/c FBS -1223 (fwd)	CCAAGATATGGTTTTATATTCCTATGAG
miR-34b/c FBS -1223 (rev)	CTTGGCCTCTCACAGTGCTA
miR-34b/c FBS -1518/12 (fwd)	TGTTAGACTGCTTATGATTACCTGAA
miR-34b/c FBS -1518/12 (rev)	AGAGTGCACCAGATTCTTAATTAGC
miR-34b/c FBS Ktr (fwd)	GGGTGTTGGAAAATGCTGAT
miR-34b/c FBS Ktr (rev)	ACAAAACAAAACCCCACATACA
<i>MK5</i> E-Box (fwd)	TAGCATCAGACTCGGGCTTT
<i>MK5</i> E-Box (rev)	TCGTCTGTCAATGGTTCTTCA
<i>MK5</i> Ktr (fwd)	GCTTCTTGGAGGCCATAGGT
<i>MK5</i> Ktr (rev)	AGCCAAAGAGGGGTGAAGAT

2.3.3 Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide (fwd = *forward*; rev = *reverse*) für die Herstellung von shRNA-Vektoren wurden von den Firmen Invitrogen bzw. Operon synthetisiert.

shMK5-a (fwd)	5'-GATCCCCTATCTGTGAATCCACGACCTTCAAG AGAGGTCGTGGATTACAGATATTTTGGAAA-3'
shMK5-a (rev)	5'-AGCTTTTCCAAAAA TATCTGTGAATCCACGACC TCTCTTGAAGGTCGTGGATTACAGATAGGG-3'
shMK5-b (fwd)	5'-GATCCCCTTAACAAGTGACAGTGCCGTTCAAG AGACGGCACTGTCACCTTGTTAATTTTGGAAA-3'
shMK5-b (rev)	5'-AGCTTTTCCAAAAATTAACAAGTGACAGTGCCG TCTCTTGAACGGCACTGTCACCTTGTTAAGGG-3'

RNA-Oligonukleotide

Wie bereits in 2.3.1 beschrieben, bestehen RNAi-Oligonukleotidgemische der Firma Dharmacon aus siRNAs mit vier verschiedenen Zielsequenzen, die gegen dasselbe Gen gerichtet sind. Zur Validierung der Zielgene aus dem *Screen* wurden RNAi-Oligonukleotide verwendet, die eine chemische Modifikation enthalten und somit seltener unspezifische Nebeneffekte auf die Zellen ausüben (siON-TARGETplus statt siGENOME). Die hier aufgeführten Sequenzen wurden von der Firma Dharmacon entworfen und synthetisiert. Zur Kontrolle diente das RNA-Oligonukleotidgemisch *ON-TARGETplus Non-Targeting siRNA #1* (Dharmacon).

siMK5-5 (a)	5'-GAUAAAGUAGAUCGACUAA-3'
siMK5-6 (b)	5'-GGAAUUAGUGGUCCAGUUA-3'
siMK5-7 (c)	5'-GCGCAAAGAAGGCAUCAGA-3'
siMK5-8 (d)	5'-UGCAAACUCCUAAGAGAU-3'
siMYC-23	5'-ACGGAACUCUUGUGCGUAA-3'
siMYC-24	5'-GAACACACAACGUCUUGGA-3'
siMYC-25	5'-AACGUUAGCUUCACCAACA-3'
siMYC-26	5'-CGAUGUUGUUUCUGUGGAA-3'

Um die Funktion von endogenen microRNAs nachzuahmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit sogenannte *miRIDIAN Mimics* (Dharmacon) verwendet. Als Kontrolle diente die *miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1* (Dharmacon).

hsa-miR-34b	5'-UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG-3'
hsa-miR-34c	5'-AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC-3'

Die Wirkung von endogenen microRNAs konnte durch Verwendung von sogenannten *miRCURY LNATM microRNA Knockdown Probes* inhibiert werden. Diese wurden von der Firma Exiqon bezogen und nach den Empfehlungen des Herstellers angewendet.

2.3.4 Plasmide

Leervektoren

pBabe <i>bleo/hygro/puro</i>	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit einem LTR (<i>long terminal repeat</i>)-Promotor und einem Bleomycin-, Hygromycin-, oder einem Puromycin-Resistenzgen (Morgenstern and Land, 1990)
pcDNA3.0	eukaryotischer Expressionsvektor mit einem CMV (Cytomegalievirus)-Promotor (Invitrogen)
pECE	eukaryotischer Expressionsvektor mit einem SV40-Promotor (Ellis et al., 1986)
pGEX4T1	bakterieller Expressionsvektor mit einem tac-Promotor zur IPTG-induzierbaren Expression von GST-Fusionsproteinen (GE Healthcare)
pMSCV <i>puro</i>	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit einem LTR-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen (Clontech)
pRETRO.SUPER <i>puro</i>	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit einem RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor (zur Expression von shRNAs) und einem Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp et al., 2002)

pWZL <i>neo</i>	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit einem LTR-Promotor und dem Neomycin-Resistenzgen (Morgenstern und Land, 1990)
-----------------	---

Expressionsvektoren

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die folgenden Expressionsplasmide hergestellt.

pBabe <i>bleo MK5</i>	pBabe <i>bleo</i> Vektor mit dem <i>MK5</i> -Gen; Wildtyp und Punktmutanten: K51M, T182D, L337G
pBabe <i>puro MYC</i>	pBabe <i>puro</i> Vektor mit dem <i>MYC</i> -Gen; enthalten sind die kodierende Sequenz (CDS), CDS mit 5'-UTR, CDS mit 3'-UTR bzw. CDS mit 5'-UTR und 3'-UTR (siehe Abb. 11B)
pBabe <i>puro FOXO3ER(6A)</i>	pBabe <i>puro</i> mit der kodierenden Sequenz für das FoxO3aER(6A)-Fusionsprotein; es wurden in das pBabe <i>puro</i> FoxO3aER(3A)-Konstrukt folgende Punktmutationen eingefügt: S215A, S551A, S555A (siehe Abb. 20A)
pcDNA3.0 <i>MK5-HA</i>	pcDNA3.0 Vektor mit dem <i>MK5</i> -Gen und einem C-terminalen <i>HA-Tag</i> ; Wildtyp und folgende Punktmutanten: K51M, T182D, L337G
pcDNA3.0 <i>MYC</i>	pcDNA3.0 Vektor mit dem <i>MYC</i> -Gen; enthalten sind die kodierende Sequenz (CDS), CDS mit 5'-UTR, CDS mit 3'-UTR bzw. CDS mit 5'-UTR und 3'-UTR (siehe Abb. 11B)
pcDNA3.0 <i>FOXO3-HA</i>	pcDNA3.0 Vektor mit der kodierenden Sequenz für <i>FOXO3</i> mit einem C-terminalen <i>HA-Tag</i> ; hergestellt als Wildtyp und als S215A-Punktmutante
pCMV-Sport6 <i>MK5</i>	pCMV-Sport6 Vektor mit dem <i>MK5</i> -Gen (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH); folgende Aminosäuren wurden einzeln durch Punktmutagenese verändert: K51M, T182D, L337G

pGEX4T1 <i>FOXO3</i>	pGEX4T1 Vektor mit der kodierenden Sequenz von <i>FOXO3</i> ; hergestellt wurden folgende Punktmutanten: S215A, S253A, S551A, S551A als Einzelmутanten bzw. als 4A-Mutante (siehe Abb. 18A)
----------------------	---

Folgende DNA-Plasmide waren bereits in der Sammlung der Arbeitsgruppe Prof. Eilers vorhanden bzw. wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt.

pBabe <i>puro dnFoxO4</i>	pBabe <i>puro</i> Vektor zur Expression von dominant-negativem FoxO4 (bestehend aus der DNA-Bindedomäne von FoxO4); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von René Medema and Boudewijn Burgering
---------------------------	--

pBabe <i>puro FOXO3ER(3A)</i>	pBabe <i>puro</i> Vektor mit der kodierenden Sequenz für das FoxO3aER(3A)-Fusionsprotein; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Anne Brunet und Caroline Bouchard
-------------------------------	--

pECE <i>HA-FOXO3</i>	pECE Vektor mit dem <i>FOXO3</i> -Gen mit einem N-terminalen <i>HA-Tag</i> ; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Anne Brunet
----------------------	---

pGEX <i>GST-FOXO3</i>	pGEX4T1 Vektor mit dem GST-FoxO3a Fusionsprotein; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Viola Paulus-Hock
-----------------------	--

pMSCV <i>puro p53DD</i>	pMSCV <i>puro p53DD</i> zur Expression von p53DD (humanes <i>TP53</i> , kodierend für die Aminosäuren 302-390), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thorsten Stiewe
-------------------------	--

pRETRO.SUPER <i>puro shKtr</i>	pRETRO.SUPER Vektor mit der Sequenz zur Expression einer Kontroll-shRNA (<i>shKtr</i>); kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt Sandra Bernard
--------------------------------	--

pWZL <i>neo, EcoR</i>	pWZL <i>neo</i> Vektor mit dem Gen für den murinen ekotrophen Rezeptor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Manuel Serrano
-----------------------	---

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Primärantikörper für Immunoblots

anti- β -Aktin	monoklonaler Maus-anti- β -Aktin (Klon AC-15, Sigma, A5441)
anti-Myc	polyklonaler Kaninchen-anti-Myc (Santa Cruz, sc-764); monoklonaler Maus-anti-Myc (Klon C-33, Santa Cruz, sc-42); monoklonaler Maus-anti-Myc (Klon 9E10, eigene Herstellung)
anti-ER	polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-ER (Santa Cruz, sc-542)
anti-Flag	monoklonaler Maus-anti-Flag (Klon M2, Sigma, F3165)
anti-FoxO3a	polyklonaler Kaninchen-anti-FoxO3a (Santa Cruz, sc-11351)
anti-FoxO3a pS215	polyklonaler Kaninchen-anti-FoxO3a pS215 (hergestellt in Kollaboration mit Harmjan Vos und Boudewijn Burgering)
anti-HA	monoklonaler Maus-anti-HA (Klon 16B12, Covance, MMS-101P)
anti-H2B	polyklonaler Kaninchen-anti-H2B (Santa Cruz, ab1790)
anti-MK5	monoklonaler Maus-anti-MK5 (Klon 13H5, AbFrontier, LF-MA0195), polyklonaler Kaninchen-anti-MK5 (H-180, Santa Cruz, sc-25419), polyklonaler Schaf-anti-MK5 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Philip Cohen und Simon Arthur)

Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

anti-ER	polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-ER (Santa Cruz, sc-542)
anti-FoxO3a	polyklonaler Kaninchen-anti-FoxO3a (Santa Cruz, sc-11351)
anti-HA	monoklonaler Maus-anti-HA (Klon 16B12, Covance, MMS-101P)
anti-Myc	polyklonaler Kaninchen-anti-Myc (Santa Cruz, sc-764)

Primärantikörper für die Immunpräzipitation und Chromatin-Immunpräzipitation

anti-ER	polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-ER (Santa Cruz, sc-542)
anti-FoxO3a	polyklonaler Kaninchen-anti-FoxO3a (Santa Cruz, sc-11351)
anti-Myc	polyklonaler Kaninchen-anti-Myc (Santa Cruz, sc-764)
rabbit-IgG	polyklonas Kaninchenserum (GE Healthcare, NA934)

2.4.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper für Immunoblots

anti-Kaninchen-HRP	Esel-anti-Kaninchen-Immunglobulin, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i> , HRP) (Amersham, NA 934)
anti-Maus-HRP:	Esel-anti-Maus-Immunglobulin, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (Amersham, NA 931)
anti-Schaf-HRP:	Kaninchen-anti-Schaf-Immunglobulin, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (Rockland, 613-4303)

Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

anti-Kaninchen-Alexa 488:	Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin, gekoppelt an den grün fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, A11008)
anti-Maus-Alexa 647:	Ziege-anti-Maus-Immunglobulin, gekoppelt an Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, A21235)

2.5 Chemikalien

Mit Ausnahme weniger Chemikalien (dann extra angegeben) wurden Produkte der Firmen Acros Organics, AppliChem, Calbiochem, Difco, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma bezogen, die der Qualität für die Molekularbiologie entsprachen. Feinchemikalien in höchstem Reinheitsgrad wurden von den Firmen Invitrogen und Sigma verwendet. Radioaktiv markierte Reagenzien (γ - ^{32}P -ATP, ^{35}S -Methionin) wurden von Hartmann Analytics erworben.

2.6 Standards und Enzyme

2.6.1 Standards

DNA-Marker	1 kb DNA Ladder (Invitrogen)
Protein-Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

2.6.2 Enzyme und Kits

Benzonase	Novagene/VWR International
cDNA Synthese Kit (miRNA)	Exiqon
DNase-freie RNase A	Sigma
MK5, aktive Kinase	Millipore
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Pfu Polymerase	Fermentas
Pfu-Turbo Polymerase	Stratagene
Qiaquick PCR purification Kit	Qiagen
qRT-PCR Mix (für miRNAs)	Exiqon
Restriktionsendonukleasen	Fermentas
	NEB New England Biolabs
RNase-freie DNase	Fermentas
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Scientific
T4-DNA-Ligase	Fermentas

2.7 Puffer und Lösungen

Blockierungslösung für PVDF-Membranen	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T 5% (w/v) bovines Serumalbumin in TBS-T
Immunfluoreszenz	0,1% (v/v) NP-40 5% (v/v) FBS in PBS
ChIP-Lysepuffer I	5 mM PIPES, pH 8 85 mM KCl 0,5 % (v/v) NP-40

Materialien

ChIP-Lysepuffer II	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 1% (w/v) DOC 0,1% (w/v) SDS 1 mM EDTA
ChIP-Waschpuffer I	20 mM Tris pH 8,1 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1% (w/v) SDS 1% (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer II	20 mM Tris pH 8,1 500 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1% (w/v) SDS 1% (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer III	10 mM Tris pH 8,1 250 mM LiCl 1% (v/v) NP-40 1% (w/v) SDS 1 mM EDTA
ChIP-Elutionspuffer	1% (w/v) SDS 100 mM NaHCO ₃
Coomassie-Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie G250 Farbstoff
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure 20% (v/v) Methanol
DNA Ladepuffer (6x)	10 mM EDTA; pH 8,0 0,2% (w/v) Orange G 40% (w/v) Saccharose
Fraktionierungspuffer A	0,34 M Sucrose 10 mM HEPES 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 10% (v/v) Glycerol
Fraktionierungspuffer B	3 mM EDTA

Materialien

	0,1 mM EGTA 1 mM DTT 1:1000 Protease-Inhibitormix (Sigma)
GST-Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl 10 mM reduziertes Glutathion pH 8,0
HBS (2x)	280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM HEPES pH 7,05
Hybridisierungspuffer (2x)	200 mM NaCl 100 mM HEPES pH 7,4
Hypotoner Lysepuffer	10 mM HEPES KOH, pH 7,9 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM DTT 0,1% (v/v) Triton X-100
Kinase-Puffer	50 mM Tris, pH 7,4 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 100 mM NaF 2 mM Na ₃ VO ₄
Kristallviolettlösung	0,1% (w/v) Kristallviolett 20% (v/v) Ethanol
Luminol-Substratlösung	100 mM Tris-HCl pH 8,5 1,25 mM Luminol 200 µM p-Cumarinsäure 90 ppm H ₂ O ₂
Mowiol-Lösung	13,3% (w/v) Mowiol 4-88 33,3% (v/v) Glycerin 0,13 M Tris, pH 8,5
NP-40-Lysepuffer	50 mM Tris, pH 8,0 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇

Materialien

	100 mM NaF 2 mM Na ₃ VO ₄
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄
PI-FACS-Puffer	38 mM Natriumcitrat 54 µM Propidiumiodid 24µg/ml RNase A
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris; pH 7,4 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 0,5% (w/v) DOC 0,1% (w/v) SDS
Sammelgel 4%	4% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1% SDS
SDS-Probenpuffer (3x)	187,5 mM Tris pH 6,8 30% (v/v) Glycerin 6% SDS 0,03% Bromphenolblau 2 M β-Mercaptoethanol
TAE (50x)	2 M Tris; pH 8,0 5,7 % Essigsäure 50 mM EDTA
Tankblot-Puffer I (10x)	1,5 M Glycin 250 mM Tris-Base
Tankblot-Puffer II (10x)	250 mM Tris-Base; pH 8,0 1,9 M Glycin 0,05% SDS

Materialien

TBS (20x)	500 mM Tris-Base; pH 7,4 2,8 M NaCl
TBS-T	25 mM Tris; pH 7,4 0,2% Tween-20 140 mM NaCl
TE	10 mM Tris; pH 8,0 1 mM EDTA
Trenngel 10 – 15%	10 – 15% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
Trypsinlösung	0,25% Trypsin 5 mM EDTA 22,3 mM Tris pH 7,4 125 mM NaCl

2.8 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien, wie z. B. Reaktionsgefäße, -röhrchen und Zellkulturmaterial wurden von den Firmen Applied Biosystems, Eppendorf, Greiner, Kimberley-Clark, Nunc, Sarstedt und VWR International bezogen.

2.9 Geräte, Membranen und Filme

Blottingapparatur	Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) Mini Wet Blot (biotech service blu)
Durchflusszytometer	BD FACS Canto (BD Biosciences)
Entwicklermaschine	Protec Compact 35 (Medtec) LAS-4000 (Fujifilm Global)
Fluoreszenzmikroskop	BD Pathway 855 (BD Biosciences) DMI 6000 B (Leica)
Heizblock	Dry Bath System (STARLAB)

Materialien

Mikroskop	Axiovert 40CFL (Zeiss)
PCR-Gerät	Mastercycler® pro S (Eppendorf)
Photometer	Ultrospec™ 3100 <i>pro</i> UV/Visible (Amersham Biosciences)
	Spektralphotometer NanoDrop 3000 (Thermo Scientific)
PVDF-Transfermembran	Immobilon-P-Transfermembran (Millipore)
qRT-PCR	Mx3000P (Stratagene)
Röntgenfilme	Fuji Super RX (Fujifilm)
Schüttelinkubator	Model G25 (New Brunswick Scientific)
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel (Bio-Rad)
	Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)
Sonifiziergerät	W-250 D (Heinemann)
Spannungsquellen	Power Pac (Bio-Rad)
Sterilwerkbank	HeraSafe (Heraeus)
Szintillationszähler	LS 6500 Multi-Purpose Scintillations Counter (Beckman Coulter)
Universalschüttler	SM-30 (Edmund Bühler GmbH)
UV-Tisch	Maxi-UV-Leuchttisch (PEQLAB)
Wasserbad	Julabo 5M-5M Bad/Umwälzthermostat (Julabo)
Whatman-Filterpapier	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Zellkulturinkubator	BBD 6220 (Heraeus)
Zellzähler	CASY® Zellzähler (Innovatis)
Zentrifugen	Galaxy MiniStar (VWR International)
	Eppendorf 5417 R (Eppendorf)
	Eppendorf 5425 (Eppendorf)
	Multifuge 1S-R (Heraeus)
	Avanti J-26 XP® (Beckman Coulter)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmid-amplifikation

Die chemisch kompetenten Bakterien des *Escherichia coli*-Stammes DH5 α wurden 15 Minuten auf Eis aufgetaut. Es wurden 100 ng bis 1 μ g eines Plasmids zugegeben und nach gründlicher Durchmischung 30 weitere Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock, bei dem das *Escherichia coli*-Plasmid-Gemisch 45 Sekunden auf 42°C erwärmt wurde. Der Ansatz inkubierte 2 Minuten auf Eis und nach Zugabe von Antibiotikum-freiem LB-Medium wurden die Bakterien 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde dann entweder abzentrifugiert, in 100 μ l Medium aufgenommen und auf einer Antibiotikum-haltigen Agarplatte ausgestrichen oder direkt in 200 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C zur Plasmidamplifikation kultiviert.

3.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Plasmid-Präparation großer Mengen (200 ml Flüssigkultur; Maxi-Präparation) erfolgte mit Hilfe des *JETSTAR 2.0 Plasmid Purification Maxi Kit* (GENOMED) gemäß den Angaben des Herstellers. Das aufgereinigte Plasmid wurde in aqua bidest. gelöst, auf eine Konzentration von 1 μ g/ μ l eingestellt und längerfristig bei -20°C gelagert.

Die Aufreinigung kleinerer Mengen Plasmid-DNA (2 ml Flüssigkultur; Mini-Präparation) wurde wie folgt durchgeführt. Die Bakterien wurden im Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A) resuspendiert, mit Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) versetzt und anschließend die Proteinbestandteile mit Puffer 3 (3,1 M Kaliumacetat, pH 5,5) denaturiert. Zur DNA-Fällung wurden die Proben abzentrifugiert (2.500 x g, 5 min, 4°C) und der Überstand mit Isopropanol versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA abzentrifugiert (18.000 x g, 5 min, 4°C), das Pellet zweimal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und in aqua bidest. gelöst. Für die DNA-Sequenzierung des Plasmids wurde die gefällte DNA in 9 M LiCl-Lösung resuspendiert

und nach Zentrifugation von Verunreinigungen (18.000 x g, 5 min, 4°C) erneut in Isopropanol gefällt und wie gewohnt gewaschen. Durch diesen zusätzlichen Schritt wurde die DNA von Verunreinigungen befreit, die eine Sequenzierungsreaktion stören würden. Die Plasmid-DNA aus Klonierungen wurde bei 4°C oder längerfristig bei -20°C gelagert. Die Vektoren der shRNA-Bibliothek wurden auf eine Konzentration von 200 ng/μl eingestellt und nach dem vorgegebenen Schema in eine 96-*well* Platte pipettiert und bei -20°C gelagert.

3.1.3 Messung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von DNA oder RNA wurde über die Absorption bei 260 nm am Spektralphotometer bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 μg/ml, bei einzelsträngiger RNA entspricht sie 40 μg/ml. Das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure. Kontaminationsfreie DNA zeigt ein Verhältnis von 1,8, während es bei RNA bei 2,0 liegt.

3.1.4 Restriktionsanalyse von DNA

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion) erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (Fermentas; NEB New England Biolabs) mit den vom Hersteller angegebenen Mengen und Reaktionspuffern. Dabei wurde je nach Art der Restriktion einer der folgenden Ansätze vorbereitet und 1 bis 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

Kontroll-Restriktion: 1 μg DNA
 0,5 μl Restriktionsendonuklease 1
 0,5 μl Restriktionsendonuklease 2
 1 μl 10x Reaktionspuffer
 ad 10 μl aqua bidest.

präparative Restriktion: 5 - 10 µg DNA
 1 µl Restriktionsendonuklease 1
 1 µl Restriktionsendonuklease 2
 2 µl 10x Reaktionspuffer
 ad 20 µl aqua bidest.

3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente

Um die Größe von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau zu überprüfen oder um DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufzutrennen, wurde die Probe auf ein 1 – 2%iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde hergestellt, indem die Agarose (1 – 2% (w/v)) in TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen wurde. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versehen und in die Geltaschen des abgekühlten Agarosegels pipettiert. Um die Größe der DNA-Fragmente beurteilen zu können, wurde ein DNA-Größenstandard (1 kb DNA Ladder, Invitrogen) verwendet. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei 110 V für 1 bis 2 Stunden. Die DNA konnte durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.1.6 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel

Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit einem Skalpell aus dem präparativen Agarosegel geschnitten. Die Gelextraktion erfolgte mit Hilfe des *Gel Extraction Kits* (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA von den Säulen erfolgte mit EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) bzw. mit Nuklease-freiem Wasser. Die aufgereinigte Nukleinsäure wurde bei -20°C gelagert.

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation, d.h. die kovalente Verknüpfung doppelsträngiger DNA-Fragmente, erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Ligase. Das zu inserierende DNA-Fragment (Insert) wurde im Fall von hybridisierten Oligonukleotiden im 240-fachen molaren Überschuss, bei größeren

DNA-Fragmenten im dreifachen molaren Überschuss verglichen mit dem Plasmid eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 12 – 16 Stunden bei 16°C inkubiert.

Ligationsansatz: 100 ng linearisiertes Plasmid
 x ng DNA-Fragment (Insert)
 1 µl T4 DNA-Ligasepuffer (Fermentas)
 1 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas)
 ad 10 µl aqua bidest.

3.1.8 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung von einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden wurden diese im Hybridisierungspuffer für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend schrittweise auf Raumtemperatur abgekühlt.

Hybridisierungsansatz: 150 pmol Oligonukleotid 1
 150 pmol Oligonukleotid 2
 25 µl 2x Hybridisierungspuffer
 ad 50 µl aqua bidest.

3.1.9 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA wurde das TRIzol® Reagenz (Invitrogen) nach Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und mit einem geeigneten Zellschaber von der Kulturschale entfernt. Nach der Zentrifugation (400 x g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml TRIzol® resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Probe gründlich gemischt und nach weiteren 5 Minuten zentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4°C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 400 µl Isopropanol versetzt. Zum Fällern wurde die Probe mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4°C). Das RNA-Pellet

wurde zweimal mit 75%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst.

3.1.10 DNase I-Verdau von RNA-Proben

Um die Expression von miRNAs oder von transfizierten Plasmiden zu bestimmen, wurde die isolierte RNA zunächst mit Hilfe von DNase I (Fermentas) von eventuellen DNA-Verunreinigungen befreit. Dazu wurden 2 µg an Gesamt-RNA für den DNase I-Verdau eingesetzt. Der DNase I-Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und Erhitzen der Proben für 10 Minuten auf 65°C wurde die DNase I inaktiviert.

DNase I-Ansatz: 2 µg Gesamt-RNA
 1 µl 10x Reaktionspuffer mit MgCl₂
 1 µl DNase I
 ad 10 µl aqua bidest.

3.1.11 cDNA-Synthese

Um die Expression bestimmter mRNAs zu analysieren, wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert und die darin enthaltenen mRNAs mit Hilfe von Zufallshexanukleotid-Primern und des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. 2 µg Gesamt-RNA wurden auf ein Volumen von 10 µl verdünnt, eine Minute bei 65°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe des cDNA-Syntheseansatzes erfolgte die cDNA-Synthese nach dem unten angegebenen Protokoll. Wurde die cDNA zur Herstellung von Expressionsvektoren benötigt (Abschnitt 3.1.12), erfolgte die cDNA-Synthese mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern. Somit wurde sichergestellt, dass die komplette kodierende Sequenz in cDNA umgeschrieben wurde, da die Primer nicht zufällig innerhalb des Transkripts, sondern nur an den Poly-A-Überhang am 3'-Ende der mRNA binden. cDNA wurde kurzfristig bei 4°C, längerfristig bei -20°C gelagert.

cDNA-Syntheseansatz:	10 µl 5x <i>First Strand Buffer</i> (Invitrogen)
	5 µl DTT (0,1 M, Invitrogen)
	5 µl dNTPs (2,5 mM, Roth)
	2 µl Zufallshexanukleotid-Primer p(dN) ₆ (2 mg/ml)
	0,2 µl RiboLock TM RNase Inhibitor (Fermentas)
	1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl, Promega)
	ad 40 µl Nuklease-freies Wasser
cDNA-Syntheseprotokoll:	22°C 10 Minuten
	37°C 50 Minuten
	70°C 15 Minuten

Zur Expressionsanalyse von miRNAs wurden Reagenzien der Firma Exiqon verwendet und die cDNA nach Angaben des Herstellers generiert. Dazu wurde die isolierte RNA zunächst einem DNase I-Verdau (Abschnitt 3.1.10) unterzogen. Anschließend wurde der cDNA-Syntheseansatz zugegeben und nach unten stehendem Protokoll inkubiert. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -20°C.

cDNA-Syntheseansatz:	11 µl Probe des DNase I-Verdau
	8 µl 5x RT Reaktionspuffer
	2 µl dNTPs
	je 2 µl der miRNA-spezifischen Primer
	2 µl RNase Inhibitor
	1 µl Reverse Transkriptase
	ad 40 µl Nuklease-freies Wasser
cDNA-Syntheseprotokoll:	50°C 30 Minuten
	85°C 10 Minuten

3.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifikation von Nukleinsäuren und wurde für folgende Zwecke eingesetzt.

PCR zur Herstellung von Expressionsvektoren

Zur Generierung von Expressionsvektoren wurde das Gen entweder aus einem bereits vorhandenen Vektor oder ausgehend von cDNA amplifiziert. Somit konnten im Zuge der PCR-Reaktion entweder neue Restriktionsschnittstellen oder eine HA-Markierung (Hemagglutinin) an das Gen angefügt werden.

PCR-Reaktionsansatz:

- 2,5 µl 10x Pfu Puffer (Fermentas)
- 0,5 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 50 ng Ausgangsplasmid / 1 µl cDNA
- 10 pmol Primer 1
- 10 pmol Primer 2
- 1 µl DMSO
- 1 µl dNTPs (2,5 mM)
- ad 25 µl aqua bidest.

PCR-Temperaturprofil:

1 Zyklus	95°C	5 Minuten
30 Zyklen	95°C	30 Sekunden
	60°C	30 Sekunden
	72°C	3 Minuten
1 Zyklus	72°C	5 Minuten

Zielgerichtete Mutagenese-PCR

Bei der zielgerichteten Mutagenese-PCR wurden die Primer so gewählt, dass einzelne Basen im Vergleich zur Wildtyp-DNA abgeändert waren. Dadurch konnten mit einer PCR-Reaktion einzelne Basen in der Ziel-DNA ausgetauscht und somit die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins verändert werden. Nach der PCR-Reaktion wurde der Ansatz mit dem Enzym DpnI für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um das methylierte Wildtyp-

Ausgangsplasmid zu hydrolysieren. PCR-generierte DNA ist nicht methyliert und wird somit durch DpnI nicht verdaut.

PCR-Reaktionsansatz: 2,5 µl 10x Pfu Puffer (Stratagene)
 0,5 µl Turbo Pfu Polymerase (Stratagene)
 50 ng Ausgangsplasmid
 10 pmol Primer 1
 10 pmol Primer 2
 1 µl DMSO
 0,5 µl dNTPs (2,5 mM)
 ad 25 µl aqua bidest.

PCR-Temperaturprofil: 1 Zyklus 94°C 3 Minuten
 20 Zyklen 95°C 30 Sekunden
 66°C 30 Sekunden
 67°C 5 – 10 Minuten
 1 Zyklus 72°C 3 Minuten

Quantitative Reverse Transkriptase-PCR

Zur Quantifizierung von mRNA-Mengen wurde die quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) eingesetzt. Die cDNA wurde, wie oben beschrieben, mit Hilfe der reversen Transkriptase synthetisiert. Für die Amplifikation wurde der PCR-Reaktionsansatz gemischt, in die Reaktionsgefäße vorgelegt und anschließend 1 µl der cDNA zugegeben.

PCR-Reaktionsansatz: 10 µl SYBR Green Mix (Thermo Scientific)
 0,5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
 0,5 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
 8 µl Nuklease-freies Wasser

Methoden

PCR-Temperaturprofil:	1 Zyklus	95°C	15 Minuten
	38 Zyklen	95°C	30 Sekunden
		60°C	20 Sekunden
		72°C	15 Sekunden
	1 Zyklus	95°C	1 Minute
		60°C	30 Sekunden
		95°C	30 Sekunden

Die Bestimmung der miRNA-Mengen erfolgte durch Reagenzien der Firma Exiqon nach den Empfehlungen des Herstellers. Für die Amplifikation wurde 1 µl der cDNA eingesetzt.

PCR-Reaktionsansatz:	10 µl SYBR Green Master Mix
	0,5 µl Universalprimer
	0,5 µl miRNA-spezifischer Primer
	8 µl Nuklease-freies Wasser

PCR-Temperaturprofil:	1 Zyklus	95°C	10 Minuten
	40 Zyklen	95°C	20 Sekunden
		60°C	1 Minute
		72°C	15 Sekunden
	1 Zyklus	95°C	1 Minute
		60°C	30 Sekunden
		95°C	30 Sekunden

Die Quantifizierung der mRNA- bzw. der miRNA-Mengen wurde anhand einer adaptiven Grundlinie und eines amplifikations-basierten Schwellenwertes bestimmt. Dabei erfolgte die Berechnung unter der Annahme einer Amplifikationseffizienz von 1 mit Hilfe der relativen C_T-Methode (Applied Biosystems User Bulletin #2). Die Gene *B2M* (Beta-2-Mikroglobulin) und *RPS14* (ribosomales Protein S14) beziehungsweise *hsa-snord44*

(kleine nukleoläre RNA) dienten zur Normalisierung. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die Standardabweichung nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz bestimmt.

3.2 Zellbiologische Methoden

Die Zellen wurden zur Kultivierung stets in einem Zellkulturinkubator bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchte und 5% CO₂ gehalten.

3.2.1 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von tiefgefrorenen Zellen wurde das Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Zellen wurden in 10 ml frisches Zellkulturmedium pipettiert und anschließend pelletiert (400 x g, 5 min, 4°C), um das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und auf eine geeignete Zellkulturschale überführt. 12 - 24 Stunden nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden mindestens zweimal passagiert (siehe Abschnitt 3.2.2), bevor sie für Experimente eingesetzt wurden.

3.2.2 Passagieren von Zellen

Zum Aufrechterhalten oder zum Expandieren einer Zelllinie sowie zur Aussaat für die einzelnen Versuche mussten die Zellen von der Kulturschale abgelöst werden. Dazu wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin wurde die Kulturschale bis zum Ablösen der Zellen bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit serumhaltigem Medium abgespült und das Zell-Trypsin-Gemisch in einem Probenröhrchen zentrifugiert (400 x g, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und ihre Konzentration entweder in einer Neubauer-Zählkammer oder mit Hilfe des CASY-Zellzählers (Innovatis) bestimmt. Die Zahl der ausgesäten Zellen hing von der Zelllinie, dem Durchmesser der neuen Kulturschale und der Versuchsdauer ab. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen bei Versuchsende noch keine 100%ige Konfluenz erreicht hatten.

3.2.3 Einfrieren von Zellen

Um eukaryotische Zellen längerfristig aufbewahren zu können, wurden sie eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen von der Kulturschale mit Trypsin abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2) und zentrifugiert (400 x g, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden in DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert, in spezielle Kryoröhrchen überführt und zunächst für einige Tage bis wenige Wochen bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.4 Transfektion von Plasmid-DNA

Zur Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurde je nach Zelllinie eine der drei hier beschriebenen Methoden gewählt. Bei einer transienten Transfektion von Expressionplasmen wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion für die weitere Analyse verwendet.

Komplexierung von DNA mit Kalziumphosphat

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion auf 10 cm-Kulturschalen ausplattiert. Zur Transfektion wurden pro Ansatz 500 µl einer DNA-Kalziumchlorid-Mischung hergestellt. Diese wurde unter Vortexen langsam zu 500 µl 2x HBS getropft, wobei sich Kalziumphosphat-DNA-Komplexe ausbildeten. Das Transfektionsgemisch wurde sofort gleichmäßig auf die Zellen getropft. 12 – 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Vollmedium versetzt.

DNA-Kalziumchlorid-Mischung 5 – 20 µg Plasmid-DNA
50 µl CaCl₂ (2,5 M)
ad 500 µl aqua bidest.

Transfektion mit Polyethylenimin

Zur Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurde auch Polyethylenimin (PEI) verwendet. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion auf 10 cm-Kulturschalen in Vollmedium ausplattiert. 4 Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel zu Transfektionsmedium (2% FCS, ohne Antibiotika). Für die Transfektion wurden

einerseits 10 µg DNA mit 600 µl PBS, andererseits 20 µl PEI (1 µg/µl) mit 600 µl PBS versetzt und jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Lösungen wurden gemischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde auf die Zellen getropft und spätestens nach 4 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Vollmedium versetzt.

Lipid-basierte Transfektion

Für die Transfektion von Zelllinien, die sich mit den oben beschriebenen Methoden nicht transfizieren ließen, wurde die Lipid-basierte Transfektion angewendet. Hierfür wurden die Zellen in 6 cm-Schalen in Antibiotika-freiem Medium ausplattiert. Für die Transfektion wurden einerseits 3 – 10 µg DNA, andererseits 10 µl des Transfektionsreagenzes LipofectaminTM 2000 (Invitrogen) mit Opti-MEM I auf 500 µl aufgefüllt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Lösungen wurden gemischt, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. 12 – 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versetzt.

3.2.5 Transfektion von doppelsträngigen Oligonukleotiden (siRNA, miRNA)

Zur Transfektion von synthetischen doppelsträngigen Oligonukleotiden wie siRNAs (Dharmacon), miRNAs (*miRIDIAN microRNA Mimics*, Dharmacon) und miRNA-inaktivierende Reagenzien (*miRCURY LNATM microRNA Knockdown Probes*, Exiqon) wurde das Lipidtransfektionsreagenz LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen) verwendet. 24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen auf 6 cm-Kulturschalen in 3 ml Antibiotika-freiem Medium (mit 10% FCS) ausplattiert. Einerseits wurden 5 - 7,5 µl Oligonukleotid (abhängig von der jeweiligen Art) einer 20 µM Stocklösung, andererseits 10 µl des Transfektionsreagenzes jeweils mit Opti-MEM I (Invitrogen) auf 500 µl verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Lösungen wurden gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der Transfektionsmix zu den Zellen getropft wurde. Die Endkonzentration der siRNA lag somit bei 25 bis 37,5 nM, die der synthetischen miRNAs bei 25 nM und die der miRNA-inaktivierenden Reagenzien bei 50 nM. Das Transfektionsreagenz lag in einer Endkonzentration von 0,25% vor. Nach 12 – 16 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zu

Vollmedium. Die Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion für die weitere Analyse geerntet.

3.2.6 Retrovirale Infektion von Säugerzellen

Die retrovirale Infektion von Plasmid-DNA bietet den Vorteil, dass die Plasmid-DNA in das Genom der Zielzellen integriert und somit eine stabile Expression erreicht wird. Da hierzu das *Moloney Murine Leukaemia Virus* (Mo-MuLV) verwendet wurde, das nur Maus- bzw. Rattenzellen infizieren kann, mussten humane Zelllinien vor der Infektion mit dem murinen ekotrophen Rezeptor transfiziert werden.

Rekombinante Retroviren wurden mit Hilfe der Verpackungszelllinie Phoenix-Eco (PHX) hergestellt. Sie stammt von der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T (ursprünglich HEK293) ab, die mit E1A und dem T-Antigen transformiert wurde (Kinsella and Nolan, 1996). Die PHX-Zellen exprimieren die viralen Genbereiche *gag*, *env* und *pol* unter Verwendung einer Resistenzkassette gegen Diphtheria-Toxin und Hygromycin.

24 Stunden vor der Transfektion wurden 4 Millionen PHX-Zellen pro 10 cm-Kulturschale ausplattiert. Die Transfektion von 30 – 40 µg von geeigneten retroviralen Expressionsvektoren (z.B. pBabe, pWZL, pRETRO.SUPER) erfolgte mit Hilfe der Kalziumphosphat-DNA-Komplexierung. Die Zellen produzieren daraufhin rekombinante Retroviren und geben sie in den Zellkulturüberstand ab. 12 – 16 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit 7 ml Vollmedium. Der erste Virusüberstand konnte 48 Stunden nach der Transfektion abgenommen, in einem Reaktionsgefäß zentrifugiert (400 x g, 5 min, 4°C), in 3 ml-Aliquots in neue Reaktionsgefäße überführt und im flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Lagerung des Virusüberstands erfolgte bei -80°C. Den PHX-Zellen wurden erneut 7 ml frisches Medium zugegeben und nach weiteren 24 Stunden der zweite Virusüberstand geerntet und eingefroren.

Für die Infektion von Zellen mit den rekombinanten Retroviren wurden diese auf 10 cm-Kulturschalen ausplattiert. Ein 3 ml-Aliquot des Virusüberstands wurde bei 37°C aufgetaut und mit 2 ml frischem Vollmedium und 5 µl einer Polybren-Lösung (Hexadimethrinbromid, Sigma, 4 µg/µl) gemischt. Das Medium der Zellen wurde abgenommen und durch das Infektionsgemisch ersetzt. Die Zellen wurden für 16 Stunden inkubiert, bevor 5 ml Vollmedium zugegeben wurden. 48 Stunden nach der Infektion

begann die Behandlung mit Zytostatika. Dabei wurde der Zeitpunkt einer erfolgreich abgeschlossenen Selektion durch Vergleich mit einer nicht infizierten Zellschale bestimmt.

3.2.7 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie

Zur Messung des DNA-Gehalts einer Zelle und somit zur Bestimmung der Verteilung der Zellzyklusphasen wurde die Propidiumiodid (PI)-Färbung mit anschließender Messung im Durchflusszytometer (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) herangezogen. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA interkaliert und eine Unterscheidung der Zellzyklusphasen der Zellen erlaubt. Somit lässt sich je nach DNA-Gehalt der Zelle unterscheiden, ob sie sich in der Zellzyklusphase G1/G0 (DNA-Gehalt: 2N), S ($>2N$, $<4N$) oder G2/M (4N) befindet. Außerdem können polyploide Zellen ($>4N$) und apoptotische Zellen („sub-G1“, $<2N$) identifiziert werden.

Der Zellkulturüberstand, der die apoptotischen Zellen enthielt, wurde in Probenröhrchen überführt. Die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin abgelöst. Sie wurden zum apoptotischen Zellkulturüberstand gegeben und zentrifugiert (400 x g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml kaltem PBS aufgenommen und tropfenweise in 4 ml kalten Ethanol gegeben. Um die Adhäsion der Zellen an das Plastik zu verhindern, wurden die Probenröhrchen vorher mit 2%iger Serumalbumin-Lösung für einige Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Diese Zellsuspension wurde bis zum nächsten Tag bei -20°C gelagert und dann auf die Färbung vorbereitet. Dazu wurde die Probe zentrifugiert (400 x g, 5 min, 4°C), das Zellpellet in PBS gewaschen und nach erneuter Pellettierung 1×10^6 Zellen für die Färbung eingesetzt. Die Zellen wurden in kleinere Reaktionsgefäße überführt und nach Pellettierung in der Propidiumiodid-Färbelösung aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 37°C konnten die Proben am Durchflusszytometer (BD FACSCanto II) gemessen werden. Dazu erfolgte die Messung bei 488 nm Anregungswellenlänge und mit einem 585 ± 21 nm Bandpassfilter (Detektor FL2) für Propidiumiodid (Emission 617 nm). Zur Messung und Analyse der Zellzyklusverteilung wurde das Programm BD FACSDiva 6.1.2 verwendet.

3.2.8 Kristallviolett-Färbung

Bei Kristallviolett handelt es sich um einen violetten Triphenylmethan-Farbstoff, der zur Färbung von Zellen auf Kulturschalen verwendet wird. Dadurch kann die Zelldichte bestimmt und anschließend quantifiziert werden. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die verbleibende Flüssigkeit gründlich entfernt und die Schalen leicht getrocknet. Nach 10-minütiger Fixierung der Zellen in 70%igem Alkohol (v/v) wurden die Kulturschalen für 30 Minuten in der Kristallviolett-Lösung inkubiert und anschließend der überschüssige Farbstoff mit Wasser abgewaschen. Die gefärbten Kulturschalen wurden einige Stunden lang getrocknet und konnten gegebenenfalls quantifiziert werden. Dazu wurde der Farbstoff in 10%iger Essigsäure durch 5-minütige Inkubation extrahiert. Von der 1:20 verdünnten Lösung erfolgte anschließend die photometrische Messung der Absorption bei 590 nm.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das zu exprimierende Protein wurde als GST-Fusionsprotein in den pGEX4T1 Vektor kloniert, der eine bakterielle Expression in *Escherichia coli* des Stammes BL21 ermöglicht. Eine klonale Übernachtskultur von 12,5 ml wurde am darauf folgenden Tag 1:20 verdünnt und für etwa 3 Stunden bei 25°C schüttelnd kultiviert. Bei einer optischen Dichte, d.h. einer Absorption im Spektralphotometer bei 600 nm, von 0,5 bis 1 wurde die bakterielle Expression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 2 - 4 Stunden bei 25°C induziert. Die Bakterien wurden anschließend pelletiert (7.700 x g, 10 min, 4°C) und zur Aufreinigung in eiskaltem PBS resuspendiert. Um eine Proteindegradation zu verhindern, wurde dem PBS und allen weiteren Puffern Protease-Inhibitoren zugesetzt und auf Eis gearbeitet. Die Bakteriensuspension wurde mit Hilfe eines Ultraschallgerätes sonifiziert (90 x 0,5 Sekunden, jeweils 0,5 Sekunden Pause, 20% Amplitude), um die Bakterienwände mechanisch zu zerstören. Dieser Suspension wurde Triton X-100 in der Endkonzentration von 1% zugesetzt und 30 Minuten bei 4°C gemischt. Die Proteinsuspension wurde durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4°C) von

unlöslichen Fragmenten und Bakterienbestandteilen getrennt und der lösliche Überstand zur weiteren Aufreinigung verwendet.

Für die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurden Glutathion-Sepharose-*Beads* (GE Healthcare) verwendet. Diese mussten zunächst durch dreifaches Waschen mit kaltem PBS von Ethanol-Rückständen befreit werden (dazwischen Zentrifugation: 500 x g, 5 min, 4°C). Die *Beads* wurden anschließend dem Bakteriensonikat zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur gemischt. Bei diesem Schritt erfolgte die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose-*Beads*. Die *Beads* wurden sedimentiert (500 x g, 5 min, 4°C) und dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden in GST-Elutionspuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Rotieren eluiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert (500 x g, 5 min, Raumtemperatur) und die Elution zweimal wiederholt. Alle drei Eluate wurden gemischt und die Qualität und Quantität mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.4) und Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.3.5) bestimmt.

3.3.2 Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten

Für die Proteinisolation aus Säugerzellen wurde das Medium von der Zellkulturschale entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS abgeschabt. Die Zellen wurden pelletiert (400 x g, 5 min, 4°C), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gegebenenfalls bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und anschließend in kaltem RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Dem Lysepuffer wurden Protease-Inhibitoren (Sigma) und bei Analyse von Phosphorylierung außerdem Phosphatase-Inhibitoren (Sigma) zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben gründlich gemischt, weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, die Proteinkonzentration bestimmt (Abschnitt 3.3.4), direkt für die weitere Analyse eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). In einer Halbmikroküvette wurden 1 ml einer 1:2 verdünnten, kommerziell erhältlichen Bradford-Lösung (Quick Start Bradford 1x Dye Reagent, Bio-

Rad) vorgelegt und 1 µl der zu messenden Probe hinzupipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm nach Abgleich mit einem Ansatz mit 1 µl des reinen Lysepuffers. Die erhaltenen Werte wurden mit einer Eichgerade verglichen und so die Proteinkonzentration berechnet.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die sogenannte diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Laemmli, 1970). 10 bis 20 µg Proteinlysate (Abschnitt 3.3.2) wurden mit Lysepuffer auf 10 µl aufgefüllt und mit 5 µl 3x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C inkubiert, abzentrifugiert und in die Geltaschen eines SDS-Polyacrylamid-Gels gefüllt. Das Gel bestand aus einem 10 bis 15%igem Trenngel und einem 4%igem Sammelgel. Zum Größenvergleich wurden 2,5 µl eines Protein-Markers aufgetragen. Die Proteinproben wurden in der SDS-PAGE-Apparatur (Bio-Rad) mit SDS-Laufpuffer für 30 Minuten bei 80 Volt und anschließend etwa 90 Minuten bei 120 Volt aufgetrennt.

3.3.5 Nachweis von Proteinen im Polyacrylamid-Gel durch Coomassie-Färbung

Zur Qualitäts- und Quantitätsprüfung von GST-Fusionsproteinen nach einer bakteriellen Expression oder zum Vergleich eingesetzter Substratmengen für einen Kinase-Assay wurde das Polyacrylamid-Gel in die Coomassie-Färbelösung gegeben und für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Um den überschüssigen Farbstoff wieder zu entfernen, wurde das Gel mehrmals mit frischer Entfärbelösung inkubiert und anschließend zur Dokumentation und zur längerfristigen Aufbewahrung getrocknet.

3.3.6 Immunoblot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.4). Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und dort immobilisiert. Dazu wurde die Membran 30 Sekunden in Methanol, 2 Minuten in aqua bidest. und 5 Minuten in Tankblot-Puffer inkubiert. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und beides zwischen

Whatman-Filterpapieren in einer Blotapparatur eingespannt. Der Proteintransfer erfolgte bei 250 mA für 1 - 2 Stunden. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und für 2 Stunden in Blockierungslösung geschwenkt. Die Membran wurde im Primärantikörper (1:1.000) über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Die meisten Antikörper wurden in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-T angesetzt, allerdings wurde für phosphospezifische Antikörper 5% (w/v) bovines Serumalbumin in TBS-T verwendet. Die Membran wurde dreimal in TBS-T gewaschen, mit Sekundärantikörper (1:5.000 in Blockierungslösung) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur rotierend inkubiert und erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine wurde durch Chemilumineszenz mit dem ECL+ Immunoblot-System (Amersham) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden entweder Röntgenfilme exponiert oder die Chemilumineszenz mit Hilfe des LAS-4000 (Fujifilm Global) visualisiert. Die Quantifizierung der Immunoblot-Ergebnisse erfolgte mittels der Programme *ImageJ* bzw. *MultiGauge* (Fujifilm Global).

3.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Hochdurchsatzanalyse der intrazellulären Myc-Lokalisation und zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurde die indirekte Immunfluoreszenz angewendet. Die Zellen wurden in speziellen 96-*well*-Platten für den *Screen* bzw. für die Routine auf Glasdeckgläschen kultiviert. Vor der Färbung mussten die Zellen zunächst fixiert werden. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 15 Minuten in 3,7%igem (w/v) Paraformaldehyd inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und entweder bei 4°C gelagert oder direkt auf die weitere Färbung vorbereitet. Die Proben wurden zweimal für 10 Minuten in 0,1 M Glycin und zweimal für 5 Minuten in 0,1% NP-40 (v/v) in PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 45 Minuten bei Raumtemperatur in Blockierungslösung und anschließend für 45 Minuten bei 37°C im Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung erfolgte die Färbung mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Alexa488 bzw. Alexa647; 1:400 in Blockierungslösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Dieser Antikörper-Lösung wurde zudem Hoechst zugesetzt (1:5.000), um zeitgleich die DNA zu färben. Die Zellen wurden erneut dreimal mit 0,1% NP-40 (v/v) in PBS und einmal mit PBS gewaschen. Im Falle des *Screens* wurden die 96-*well*-Platten mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln

aufbewahrt. Dahingegen wurden die Deckgläschen einmal in aqua bidest. gewaschen und mit einem Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gelegt. Die Ränder wurden mit klarem Nagellack versiegelt und die Objektträger bis zur Messung bei 4°C dunkel gelagert.

3.3.8 Bestimmung der Proteinhalfwertszeit

Um die Halfwertszeit eines Proteins zu bestimmen, wurden die Zellen mit 100 µg/ml Cycloheximid inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen für die Proteinextraktion und den anschließenden Immunoblot geerntet. Die exponierten Röntgenfilme wurden digitalisiert, mit Hilfe des Programms *ImageJ* quantifiziert und anhand dessen die Halfwertszeit berechnet.

3.3.9 Radioaktive Analyse der Kinase-Aktivität *in vitro*

Die Bestimmung der Kinase-Aktivität wurde *in vitro* mit rekombinanter aktiver Kinase (MK5, Millipore) und GST-gekoppeltem Substrat durchgeführt. Als Positivkontrolle diente GST-Hsp27 (*heatshock protein 27*) (United States Biological). Die GST-FoxO3a-Proteine (Gesamtlänge, Deletionsmutanten, jeweils Wildtyp und Punktmutanten) wurden, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, bakteriell exprimiert und mittels GSH-Beads aufgereinigt. Die unten stehenden Reagenzien wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend bei 30°C für 1 Stunde inkubiert.

Reaktionsansatz:	200 ng aktive Kinase
	1 µg Substrat
	5 µCi γ - ³² P-ATP (10 µCi/µl)
	0,6 µl ATP (1 mM)
	ad 25 µl Kinase-Puffer
	(mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren)

Anschließend wurden 10 µl 3x SDS-Probenpuffer zugegeben, die Proben 5 Minuten bei 95°C inkubiert und mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.4) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die Phosphorylierung des Substrats durch Autoradiografie detektiert. Dazu wurde ein Röntgenfilm für 2 bis 24 Stunden bei -80°C exponiert.

3.3.10 *In vivo*-metabolische Markierung von Proteinen zur Bestimmung der Translationsrate

Die Bestimmung der Translationsrate wurde mit Hilfe von radioaktiv-markiertem ^{35}S -Methionin durchgeführt. Dazu wurden Zellen für 15 Stunden in Methionin-freiem Medium (Sigma) kultiviert. Dem Medium wurde 4 mM Glutamin, 1:100 Penicillin/Streptomycin und dialysiertes FBS (3x 1:10 gegen PBS) zugesetzt. Durch die Dialyse wurde im FBS enthaltenes, nicht-radioaktiv-markiertes Methionin entfernt. Für die radioaktive Markierung der Proteine wurden die Zellen für 15 Minuten mit warmem Vollmedium (mit dialysiertem FBS) vorinkubiert und schließlich 500 μCi von ^{35}S -Methionin zugegeben. Die Kulturschalen wurden in größere Kulturschalen eingebettet, die mit Aktivkohle ausgelegt waren, um austretende radioaktive Dämpfe zu adsorbieren. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und pelletiert (400 x g, 3 min, 4°C). Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert (Abschnitt 3.3.2) und anschließend eine Trichloressigsäure (TCA)-Fällung zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität durchgeführt. Dazu wurden jeweils 5 μl des Lysates auf ein rundes Whatman-Filterpapier aufgetragen und luftgetrocknet. Die Proben wurden anschließend für jeweils 2 Minuten in folgenden eiskalten Lösungen inkubiert: einmal 10% TCA (v/v), zweimal 5% TCA (v/v), einmal 100% Ethanol, zweimal 70% Ethanol (v/v). Die Whatman-Filterpapiere wurden erneut getrocknet, in Szintillationsröhrchen überführt, mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) überschichtet und im Szintillationszähler (Beckman Coulter) vermessen.

Die Proben wurden anschließend einer Immunpräzipitation (Abschnitt 3.3.11) unterzogen. Dabei wurden für die unterschiedlichen Proben gleiche Mengen an radioaktiv markierten Proteinen für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 3.3.4), das Gel einer Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.3.5) unterzogen und getrocknet. Die Exposition von Röntgenfilmen erfolgte bei -80°C für 6 bis 48 Stunden.

3.3.11 Immunpräzipitation

Zur Aufreinigung oder Anreicherung von Proteinen wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dabei wird das Protein mit Hilfe eines Antikörpers über Sepharose-*Beads* isoliert. Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, wird parallel eine Immunpräzipitation mit einem Kontrollantikörper der gleichen Spezies durchgeführt.

Die Zellen wurden in RIPA-Lysepuffer lysiert (Abschnitt 3.3.2), sonifiziert (4 x 5 Sekunden, jeweils 10 Sekunden Pause, 20% Amplitude) und nach der Zentrifugation (18.000 x g, 10 min, 4°C) eine Bestimmung der Proteinkonzentration (Abschnitt 3.3.3) durchgeführt. Bei endogenen IPs wurde 1 mg, bei exogenen IPs 300 bis 500 µg Proteinlysate verwendet. Die Proben wurden mit Lysepuffer auf 500 µl aufgefüllt, mit 50 µl einer 10%igen BSA-Lösung (w/v) und 2 µg Antikörper (spezifischer Primärantikörper bzw. Kontrollantikörper) versetzt und über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 40 µl einer 50%igen Sepharose-*Beads*-Lösung (durch zweimaliges Waschen mit Lysepuffer wurden Ethanol-Reste entfernt) zugegeben und für 2 – 4 Stunden bei 4°C rotiert. Die Proben wurden zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C), zweimal mit 1 ml Lysepuffer, einmal mit 1 ml Hochsalz-Lysepuffer (Lysepuffer mit 200 mM NaCl), zweimal mit 1 ml Lysepuffer und einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Sepharose-Kügelchen wurden schließlich mit 25 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und die Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.4) der Größe nach aufgetrennt.

3.3.12 Chromatin-Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) kann bestimmt werden, ob ein Protein an einen bestimmten DNA-Sequenzbereich *in vivo* bindet. Dafür wurden zunächst die DNA-gebundenen Proteine mit Hilfe von Formaldehyd an die DNA quervernetzt. Das isolierte Chromatin wurde durch Ultraschallbehandlung fragmentiert. Das gewünschte Protein wurde immunpräzipitiert und das daran quervernetzte Chromatin in einer quantitativen PCR untersucht. Als Kontrolle zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen dienten zum einen ein Kontrollantikörper der gleichen Spezies, zum anderen Primer, die eine Kontrollregion mindestens 2 bis 4 Kilobasenpaare stromaufwärts oder –abwärts der vermuteten Bindung amplifizieren. Die DNA-Bindung wird nach der Immunpräzipitation als prozentualer Anteil der eingesetzten DNA-Menge angegeben.

Isolierung des Chromatins

Zunächst wurden die zellulären Proteine mit Formaldehyd (1% (v/v)) für 10 Minuten bei 37°C an die DNA quervernetzt. Um das Formaldehyd zu neutralisieren, wurden die Zellen anschließend mit 0,125 M Glycin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, von der Platte geschabt und zentrifugiert (400 x g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in ChIP-Lysepuffer I mit Protease-Inhibitoren (1:1.000) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C) und das Pellet in ChIP-Lysepuffer II mit Protease-Inhibitoren (1:1.000) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden das Chromatin durch Ultraschallbehandlung (6 x 15 Sekunden, jeweils 30 Sekunden Pause, 25% Amplitude) in 200 bis 500 Basenpaar lange Fragmente zerkleinert. Hierbei wurde das Lysat stets mit einem Ethanol-Eis-Gemisch gekühlt. Das Lysat wurde zentrifugiert (18.000 x g, 15 min, 4°C) und der Überstand gesammelt. Die Proben konnten nun entweder für einige Tage bei 4°C oder schockgefroren für mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden.

Überprüfung der Fragmentierungs-Effizienz der Ultraschallbehandlung

50 µl des aufgereinigten Chromatins wurden mit 2 µl RNase A (10 mg/ml, Roche) und 1 µl Proteinase K (10 mg/ml, Roche) versetzt und 3 Stunden bei 55°C und anschließend 12 Stunden bei 65°C revertiert. 15 µl der Probe wurden auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und überprüft, ob die Chromatin-Fragmentgröße zwischen 200 und 500 Basenpaaren lag. Falls das Chromatin noch zu große Fragmente enthielt, wurde die Ultraschallbehandlung wiederholt. Um die Chromatinmenge zu bestimmen, wurden 30 µl des Chromatins über eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Fällung aufgereinigt. Hierfür wurden 270 µl TE-Puffer und 300 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches zugefügt und 30 Sekunden kräftig gemischt. Nach der Zentrifugation (18.000 x g, 5 min, 4°C) wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl Isopropanol und 50 µg Glykogen versetzt und nach kräftiger Durchmischung für 30 Minuten bei -80°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend zentrifugiert (18.000 x g, 15 min, 4°C), mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach Resuspension in TE-Puffer wurde die DNA-Konzentration bestimmt (Abschnitt 3.1.3).

Blockieren der Protein G-Sepharose-Beads und *Preclearing* des Chromatins

Die Protein G-gekoppelten Sepharose-Beads (Sigma) wurden zweimal in ChIP-Lysepuffer II gewaschen. Sie wurden anschließend als Gemisch bestehend aus 50% *Beads* und 50% ChIP-Lysepuffer II bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Zum Blockieren wurden pro IP 120 µl der *Beads*-Lösung mit 10 ml ChIP-Lysepuffer II resuspendiert, mit Protease-Inhibitoren (1:1.000), 1 mg/ml BSA und 200 µg/ml sonifizierter Lachssperma-DNA (Invitrogen) versetzt und über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Für das *Preclearing* des Chromatins wurden die blockierten *Beads* zentrifugiert (150 x g, 5 min, 4°C) und dem Chromatin zugesetzt. Das Gemisch wurde auf 500 µl aufgefüllt und 2 - 4 Stunden bei 4°C rotiert. Somit wurden Chromatinfragmente, die unspezifisch an die Protein G-Sepharose binden, entfernt. Dieses vorgereinigte Chromatin wurde mit Protein G-Sepharose gemischt, an die bereits zuvor ein unspezifischer Kontrollantikörper gekoppelt worden war. In diesem Schritt wurden Chromatinfragmente entfernt, die unspezifisch an den Antikörper binden.

Chromatin-Immunpräzipitation

Im Anschluss an das *Preclearing* wurden die Proben zentrifugiert (150 x g, 5 min, 4°C) und 1% des Chromatins als *Input*-Probe entnommen und bei 4°C bis zur weiteren Aufreinigung gelagert. Das restliche Chromatin wurde entsprechend der Anzahl der Immunpräzipitationen gleichmäßig auf neue Reaktionsgefäße verteilt. Das Chromatin wurde mit ChIP-Lysepuffer II auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt und jedem ChIP-Ansatz 2 – 4 µg des gewünschten Antikörpers zugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C rotiert. Am Morgen wurden die Proben mit jeweils 60 µl der blockierten *Beads* versetzt und für 2 Stunden bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (150 x g, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die *Beads* wurden nun mit jeweils 1 ml der folgenden Puffer gewaschen: zweimal ChIP-Waschpuffer I, dreimal ChIP-Waschpuffer II, viermal ChIP-Waschpuffer III, einmal TE-Puffer. Bei jedem Waschpufferwechsel wurden die Proben in ein neues Reagenzgefäß überführt. Beim Waschen mit dem ChIP-Waschpuffer III wurden die Proben vor der Zentrifugation 5 min bei 4°C rotiert.

Elution und Auflösen der Quervernetzung der immunpräzipitierten DNA

Zur Elution des Chromatins wurden die *Beads* mit 250 µl ChIP-Elutionspuffer rotierend bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert (1.000 x g, 5 min, Raumtemperatur) und der Überstand entnommen. Dieser Elutionsschritt wurde mit weiteren 250 µl ChIP-Elutionspuffer wiederholt, die beiden Eluate gemischt und mit 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 40 mM Tris pH 6,5, 0,04 µg/µl Proteinase K und 0,02 µg/µl RNase A versetzt. Die *Input*-Proben wurden ebenfalls mit 500 µl ChIP-Elutionspuffers gemischt und mit oben genannten Reagenzien versetzt. Die Proben wurden 3 Stunden bei 55°C und anschließend über Nacht bei 65°C inkubiert, um die Quervernetzung der DNA zu lösen.

Aufreinigung und Amplifikation der immunpräzipitierten DNA

Die Aufreinigung der immunpräzipitierten DNA und der *Input*-Probe erfolgte mit Hilfe des *Qiaquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Elution wurde mit 50 µl des EB-Puffers des *Kits* durchgeführt und die DNA-Proben bei 4°C bzw. längerfristig bei -20°C gelagert. Dabei wurde 1 µl der Probe als qRT-PCR in Triplikaten amplifiziert und als prozentualer Anteil der *Input*-DNA dargestellt.

3.3.13 Demethylierung von potentiellen CpG-Inseln *in vivo*

Um methylierte DNA *in vivo* zu demethylieren, wurde der Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin (AzadC) und der Histondeacetylase-Hemmer Trichostatin A (TSA) verwendet. Die Zellen wurden 72 Stunden mit AzadC behandelt (Caco-2: 10 µM, HT-29: 5 µM, Ls174T: 10 µM), wobei alle 24 Stunden neues Medium und neues AzadC auf die Zellen gegeben wurden. 24 Stunden vor dem Abernten wurde den Zellen TSA (Caco-2: 80 nM; HT-29: 300 nM; Ls174T: 300 nM) zugesetzt. Die Expression der zu untersuchenden Gene wurde mittels qRT-PCR (Abschnitt 3.1.12) beziehungsweise SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.4) und anschließendem Immunoblot (Abschnitt 3.3.6) untersucht.

3.4 Bioinformatische Analyse

3.4.1 Nukleinsäure-Analyse

Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen von Genen und Proteinen wurden von der Datenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) verwendet. Primer wurden mit Hilfe der Programme Primer X (für die Punktmutagenese), Primer 3 (für die Chromatin-Immunpräzipitation) bzw. der Universal ProbeLibrary (Roche; für qRT-PCR Primer) erstellt. Die Sekundärstruktur von RNA wurde durch das Programm *Sfold* ermittelt. Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe des Programms ApE (*A Plasmid Editor*) analysiert.

3.4.2 Bestimmung von putativen CpG-Inseln

Die Position des Transkripts wurde aus der Datenbank Genecards abgelesen. Die Positionsinformation wurde in den *UCSC Genome Browser* eingegeben und ca. 2000 Basenpaare des Promotors und 2000 Basenpaare des Transkripts extrahiert. Diese Sequenz wurde mit Hilfe des Programms *CpG island searcher* (Takai and Jones, 2003) auf das Vorhandensein putativer CpG-Inseln analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Identifikation von MK5 als Myc-regulierende Kinase mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-basierten Hochdurchsatzanalyse

4.1.1 Aufbau und Etablierung der Hochdurchsatzanalyse

Myc spielt eine zentrale Rolle in vielen biologischen Prozessen und ist in 70% der humanen Tumoren überexprimiert. Dabei ist das *MYC*-Gen selten mutiert, sondern meist liegt eine Amplifikation des *MYC*-Genlokus oder eine erhöhte Myc-Stabilität vor. So führt beispielsweise ein aktiver Ras-Signalweg (Sears et al., 1999) oder die Überexpression der Ubiquitin-spezifischen Protease USP28 (Popov et al., 2007) zur Stabilisierung von Myc. Um weitere Mechanismen der post-transkriptionellen Myc-Regulation zu identifizieren, sollte ein *Screening*-Verfahren etabliert werden, bei dem durch RNA-Interferenz die Expression einzelner Gene vermindert und anschließend der Effekt auf die Myc-Proteinmenge gemessen wird.

Um transkriptionelle Effekte der Myc-Regulation im *Screen* auszuschließen, wurde das *MYC*-Gen unter Kontrolle eines retroviralen LTR (*long terminal repeat*) stabil exprimiert. Der Hochdurchsatz-*Screen* wurde in der humanen Osteosarkom-Zelllinie U2OS durchgeführt. Da in dieser Arbeit mit ekotrophen Retroviren gearbeitet wurde, die ausschließlich Nagerzellen infizieren können, wurden die U2OS-Zellen mit einem Expressionsvektor für den murinen ekotrophen Rezeptor transfiziert. Anschließend wurden PHX-Zellen mit einem Expressionsvektor für das *MYC*-Gen transfiziert und die U2OS-Zellen mit dem Virusüberstand infiziert. Die U2OS-Zellen wurden selektioniert und klonal expandiert. Um in der Hochdurchsatzanalyse sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte auf die Myc-Proteinmengen detektieren zu können, wurde ein Zellklon verwendet, der eine etwa 3-fache Myc-Überexpression gegenüber endogenem Myc aufwies (Daten nicht gezeigt).

Ein wichtiger Mechanismus der post-transkriptionellen Regulation von Proteinen involviert die Phosphorylierung. Aus diesem Grund wurden für die Hochdurchsatzanalyse RNAi-Bibliotheken, die gegen die humanen Proteinkinasen gerichtet sind, verwendet. Das humane Kinom umfasst ca. 600 Proteinkinasen, die sich in verschiedene Untergruppen einteilen lassen. Aufgrund der schwer vergleichbaren Analyse mit Hilfe von

Standardmethoden wie Immunoblots wurde für die Hochdurchsatzanalyse ein System ausgewählt, das Immunfluoreszenz-Färbungen automatisiert messen und quantifizieren kann.

Für die Bestimmung der Myc-Proteinmengen durch indirekte Immunfluoreszenz wurde zunächst die Spezifität eines kommerziell erhältlichen Antikörpers getestet. Die Visualisierung der Myc-Proteinmengen erfolgte durch einen kommerziellen anti-Myc-Primärantikörper und einen Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper. Zellen, die mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden, dienten als Referenz für die intrazellulären Myc-Proteinmengen (Abb. 5A, links). Die Transfektion mit siMYC führte in den Zellen zu einer Reduktion der Myc-Signalintensität (Abb. 5A, Mitte). Um eventuelle Kreuzreaktionen durch den Sekundärantikörper auszuschließen, wurden Kontrollzellen ohne Primärantikörper, aber mit Sekundärantikörper inkubiert (Abb. 5A, rechts). Hierbei wurde kein Myc-Fluoreszenz-signal detektiert. Dies bestätigt, dass der in dieser Arbeit verwendete anti-Myc-Antikörper spezifisch das vorwiegend nukleäre Protein Myc detektiert und sich Unterschiede in der Myc-Proteinexpression quantitativ messen lassen (Abb. 5A).

Für die Depletion der Kinasen wurden in der Hochdurchsatzanalyse zwei verschiedene RNAi-Bibliotheken eingesetzt (Abb. 5B). Zum einen wurde eine shRNA-Bibliothek verwendet, die am Nederlands Kanker Instituut (NKI, Amsterdam) hergestellt wurde. Die verwendete Subbibliothek war gegen das humane Kinom gerichtet und enthielt pro Probe drei shRNA-Vektoren gegen jede einzelne Kinase (Bernards et al., 2006). Die shRNA-Expression erfolgte mit Hilfe des Vektors pRETRO.SUPER, der eine retrovirale Infektion der Zielzellen ermöglichte. Dabei wurden die Retroviren mit Hilfe der humanen Phönix-Verpackungszelllinie hergestellt (Kinsella and Nolan, 1996). Durch die im Vektor vorhandene Puromycin-Resistenzkassette ließen sich die infizierten U2OS-Zellen selektionieren. Drei Tage nach Beginn der Selektion wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung fixiert.

Die zweite, im *Screen* eingesetzte siRNA-Bibliothek (Dharmacon/ThermoFisher Scientific) ist ebenfalls gegen das humane Kinom gerichtet (Abb. 5B). Hier enthielt jede siRNA-Probe ein Gemisch aus vier verschiedenen Sequenzen gegen jede Kinase. Bei der Verwendung der siRNA-Bibliothek wurden die U2OS-Zellen mit den synthetischen Oligonukleotiden transfiziert und nach 72 Stunden für die Immunfluoreszenz fixiert.

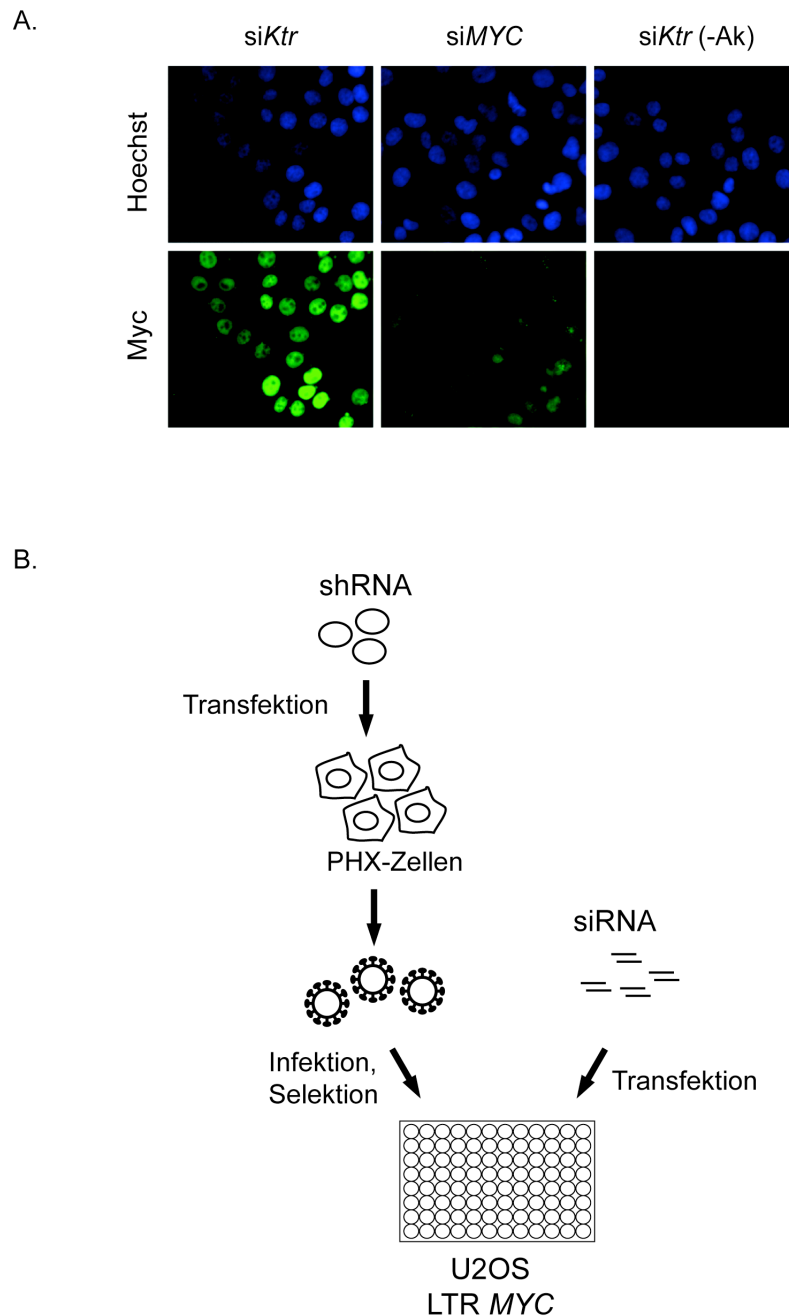


Abbildung 5: Eine Immunfluoreszenz-basierte Hochdurchsatzanalyse ermöglicht die Identifizierung von Kinasen, die die Myc-Proteinexpression post-transkriptionell regulieren.

- (A) Die indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht die Quantifizierung von intrazellulären Myc-Proteinmengen. U2OS-Zellen wurden entweder mit einer Kontroll-siRNA (siKtr) oder mit siMYC transfiziert und 72 h später mit Paraformaldehyd fixiert. Die intrazellulären Myc-Proteinmengen wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz detektiert. Hoechst diente zur Visualisierung der Zellkerne. Als Hintergrundkontrolle wurden siKtr-transfizierte Zellen ohne Primärantikörper (-Ak), aber mit einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.
- (B) RNAi-Bibliotheken ermöglichen die Analyse der post-transkriptionellen Regulation der Myc-Proteinexpression. Für die Analyse wurden U2OS-Zellen, die das *MYC*-Gen stabil unter der Kontrolle eines retroviralen LTR (*long terminal repeat*) exprimieren, verwendet. Sie wurden entweder mit shRNA-kodierenden Retroviren infiziert und selektioniert oder mit siRNA transfiziert und 72 h später für die Immunfluoreszenz fixiert. Als Bibliotheken dienten eine shRNA-Bibliothek (Bernards et al., 2006) oder eine siRNA-Bibliothek (Dharmacon/ThermoFisher Scientific), die jeweils gegen die humanen Kinasen gerichtet waren.

4.1.2 Durchführung und Messung der *Screens*

Die Durchführung der *Screens* erfolgte im 96-*well*-Format, wobei pro *well* einer Platte je eine einzelne Kinase depletiert wurde. Durch die Positionsinformation der shRNA/siRNA-Bibliotheken konnte somit jedem späteren Kandidaten der Myc-regulierenden Gene jeweils eine spezifische Kinase zugeordnet werden. Die *Screens* wurden in biologischen Replikaten durchgeführt. Die shRNA-Bibliothek wurde dreimal unabhängig voneinander eingesetzt, während die siRNA-Bibliothek zweimal analysiert wurde.

Zur Bestimmung der zellulären Myc-Proteinmengen wurden die gefärbten 96-*well*-Platten mit Hilfe des *BD Pathway™ 855* (BD Biosciences) gemessen. Dabei handelt es sich um ein Fluoreszenzmikroskop, das nach Erstellung eines geeigneten Messprotokolls die Fokussierung der Zellebene, die Belichtung der Proben und die Aufnahme der Fluoreszenzbilder automatisiert durchführt. Pro *well* wurden 9 Aufnahmen angefertigt, deren Positionen gleichmäßig über die Fläche verteilt waren. Somit wurden eventuelle Effekte, die durch die Lage der Zellen innerhalb eines *well*s beeinflusst werden, minimiert. Das Mikroskop brachte die Zellen mit Hilfe der Hoechst-Färbung in Fokus und belichtete sie dann für die manuell vorgegebene Belichtungsdauer. Diese wurde vor der Messung anhand von Kontroll-Zellen der jeweiligen 96-*well*-Platte optimiert. Die Belichtung wurde so gewählt, dass das Fluoreszenzsignal der Zellen sich im mittleren linearen Bereich befand, um sowohl positive als auch negative Veränderungen der Myc-Proteinexpression messen zu können. Durch die gleiche Belichtungsdauer bei allen *well*s einer Platte wurde gewährleistet, dass gemessene Unterschiede der Myc-Proteinmengen durch veränderte Proteinlevel verursacht wurden.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe des Programms *BD AttoVision™* (BD Biosciences) analysiert (Abb. 6). Dabei wurde zunächst das Bild mit der Hoechst-Färbung bearbeitet (Abb. 6A). Das Programm definierte anhand der Verteilung der Hoechst-Signalintensität innerhalb jedes Bildes die Zellkerne, auch ROIs (*regions of interest*) genannt, und teilte jeweils eine Nummer zu (Abb. 6B). Verschiedene Parameter, wie z. B. die Größe eines Zellkerns, konnten manuell definiert werden, um apoptotische, sich überlappende Zellen oder Messartefakte zu unterscheiden und gegebenenfalls von der Auswertung auszuschließen. Zu jeder ROI wurden die Position innerhalb des Bildes, die Größe und die Signalintensität gespeichert. Mit Hilfe dieser definierten Nuklei wurde dann eine Maske erstellt (Abb. 6C). Anhand der Myc-Färbung (Abb. 6D) und der Positions-

information der Nukleus-Maske wurde anschließend die Myc-Proteinexpression jeder einzelnen Zelle quantifiziert.

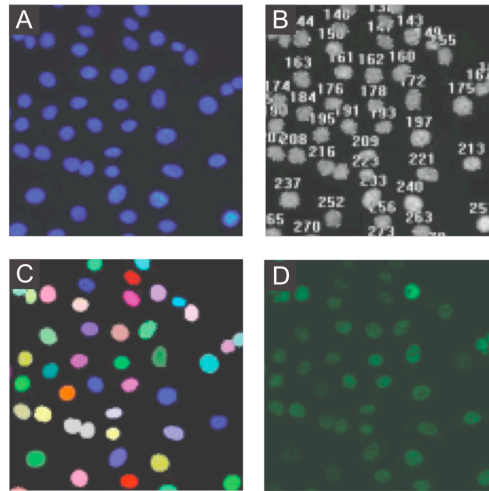


Abbildung 6: Die Quantifizierung der Myc-Proteinexpression erfolgte automatisiert.

Als Ausgangspunkt für die Analyse diente die Hoechst-Färbung (A). Das Programm *BD AttoVision™* (BD Biosciences) erkannte die Zellkerne und teilte jedem Nukleus eine eigene Nummer zu (B). Anhand dieser Hoechst-Färbung entwickelte das Programm nun eine Maske zur Abgrenzung der Zellkerne. Diese Maske wurde auf die Myc-Immuno-Fluoreszenzfärbung (D) angewendet und die nukleäre Myc-Proteinexpression quantifiziert.

4.1.3 Auswertung der *Screens*

Die Rohdaten der *Screens* wurden von Birgit Samans (IMT Marburg) analysiert. Für die Beurteilung der Auswertbarkeit und der Aussagekraft der *Screens* wurden die Daten zunächst einer Qualitätsprüfung unterzogen. Dazu wurde der Qualitätsparameter *Z'*-Faktor bestimmt (Zhang et al., 1999). Der *Z'*-Faktor wird über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Positiv- und Negativkontrollen der 96-*well*-Platten berechnet und gibt an, ob die Daten eine ausreichend große Messbreite umfassen und somit RNAi-induzierte Unterschiede auseinander gehalten werden können. Der *Z'*-Faktor wird folgendermaßen berechnet:

$$Z' \text{-Faktor} = [(MW_{\text{Pos}} - 3 SD_{\text{Pos}}) - (MW_{\text{Neg}} + 3 SD_{\text{Neg}})] / (MW_{\text{Pos}} - MW_{\text{Neg}})$$

MW_{Pos} = Mittelwert der Signalintensitäten der Positivkontrollen (si*Ktr*)

MW_{Neg} = Mittelwert der Signalintensitäten der Negativkontrollen (- Primärantikörper)

SD_{Pos} = Standardabweichung der Signalintensitäten der Positivkontrollen

SD_{Neg} = Standardabweichung der Signalintensitäten der Negativkontrollen

Liegt der Z' -Faktor zwischen 0,5 und 1, ist die Qualität der Platte optimal, zwischen 0 und 0,5 akzeptabel (Iversen et al., 2006). Liegt der Z' -Faktor im negativen Bereich, müssen der Aufbau und die Durchführung des *Screens* optimiert werden. Die Z' -Faktor-Werte in den hier beschriebenen *Screens* lagen meist zwischen 0 und 0,7 (Daten nicht gezeigt), was für eine gute Qualität der *Screens* spricht. Insgesamt waren die Z' -Faktor-Werte im shRNA-Screen etwas niedriger als diejenigen im siRNA-Screen (Daten nicht gezeigt).

Bereits in den Vorversuchen für die Hochdurchsatzanalyse waren Positionseffekte (Reihen- und Spalteneffekte) innerhalb der 96-*well*-Platten ersichtlich. So befanden sich in den Randspalten und -reihen meist weniger Zellen als in der Mitte der Mikrotiterplatten. Da die Messung einer Platte am Fluoreszenzmikroskop bis zu 3 Stunden in Anspruch nahm, wurde zudem teilweise ein systematischer, geringer Abfall in der Signalintensität zwischen den ersten und den letzten gemessenen *wells* beobachtet. Für diese Fehler wurden von Birgit Samans geeignete Normalisierungen bzw. Fehler-Korrekturen vorgenommen.

Da für statistische Tests und zur Vergleichbarkeit der *Screens* untereinander die Daten normalverteilt sein mussten, wurden sie einer Log2-Transformation unterzogen. Dabei waren die Alexa488-Intensitäten bei hohen Zellzahlen etwas geringer als bei niedrigen Zellzahlen pro *well*. Hierfür wurden die Daten einer *Lowess*-Normalisierung (*locally weighted linear regression analysis*), einer sogenannten lokalen linearen Regression, unterzogen. Es wurde eine Regressionsgerade der Daten erstellt und die Abweichung jedes Messwertes von der Geraden abgezogen.

Je nach Qualität der Antikörperfärbung und der Belichtungszeit pro Mikrotiterplatte wurden leicht unterschiedliche absolute Intensitätswerte für die Alexa488-Fluoreszenz erhalten. Um Ergebnisse unterschiedlicher Platten miteinander vergleichen zu können, wurde eine sogenannte *z*-Wert-Transformation durchgeführt. Dabei geht man davon aus, dass die Mehrheit aller Kinasen einer 96-*well*-Platte keinen Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation der Myc-Proteinexpression hat. Somit ließen sich der Mittelwert und die Standardabweichung einer jeden Platte berechnen. Für die Alexa488-Intensitäten eines jeden *wells* einer Platte wurde die Abweichung vom Mittelwert der Platte berechnet und als Vielfaches der Standardabweichung dargestellt. Ein *z*-Wert von 3 bedeutet beispielsweise, dass der Wert des *wells* drei Standardabweichungen vom Mittelwert der ganzen Platte abweicht.

Im Folgenden sind die Ergebnistabellen der beiden *Screens* dargestellt:

Tabelle 1: Ergebnisliste des shRNA-Screens

Der shRNA-Screen wurde als biologisches Triplikat durchgeführt. In der Ergebnisliste sind Treffer dargestellt, bei denen Daten aus mindestens 2 Messungen vorhanden waren und deren Mittelwert des z-Wertes über 1,0 lag. Dabei wurden nur Werte einbezogen, bei denen die gemessene Zellzahl pro *well* mindestens 150 betrug. Positive z-Werte bedeuten eine erhöhte, negative Werte eine verminderte Myc-Proteinexpression verglichen mit dem Mittelwert aller Myc-Signalintensitäten einer bestimmten Mikrotiterplatte.

ID-Nummer	Symbol	z-Wert Screen 1	z-Wert Screen 2	z-Wert Screen 3	Mittelwert z-Wert
NM_002754	MAPK13	2,22		3,20	2,71
AL137348	RRM2B	1,66		2,29	1,97
NM_001258	CDK3	0,62	1,37	3,30	1,76
NM_015716	MINK1	0,82	1,61	2,44	1,63
NM_138980	MAPK10	1,93		1,17	1,55
NM_007118	TRIO	1,93	0,62	1,96	1,51
NM_002227	JAK1		0,51	2,38	1,45
NM_000215	JAK3	0,98	2,62	0,35	1,32
AJ409088	WNK3		1,99	0,57	1,28
NM_000297	PKD2	1,21	0,99	1,31	1,17
NM_000075	CDK4	0,82	2,19	0,36	1,12
NM_005465	AKT3	0,86		1,33	1,09
NM_058241	CCNT2	1,03	0,94	1,30	1,09
AF076974	TRRAP		1,35	0,80	1,08
NM_015092	SMG1	0,80	1,34		1,07
NM_004612	TGFBR1	1,11	0,71	1,18	1,00
NM_001238	CCNE1	-1,75	-0,72	-0,58	-1,02
NM_003954	MAP3K14	-0,45	-0,43	-2,18	-1,02
NM_005569	LIMK2	0,18	-2,96	-0,41	-1,07
AB040960	ALPK1	-2,56	-0,80	0,11	-1,08
NM_004304	ALK	-1,11	-1,73	-0,45	-1,10
NM_014791	MELK	-1,06	-1,36	-1,17	-1,20
NM_014413	EIF2AK1	-1,83	-1,67	-0,38	-1,29
AL122055	CDC2L6	-1,93	-0,99	-1,02	-1,31
NM_001787	CDC2L1	-2,36	-0,51	-1,19	-1,35
NM_003582	DYRK3		-2,93	-0,13	-1,53
U43195	ROCK1	-3,03	-1,36	-1,01	-1,80
NM_001345	DGKA	-0,45	-0,85	-4,23	-1,84
NM_000162	GCK	0,14	-1,15	-4,57	-1,86
NM_002878	RAD51L3	-0,73		-3,94	-2,34

Tabelle 2: Ergebnisliste des siRNA-Screens

Der siRNA-Screen wurde zweimal durchgeführt und für die Analyse nur die Kinasen berücksichtigt, für die zwei Messwerte vorhanden waren. In der Ergebnisliste sind diejenigen Treffer aufgeführt, deren Mittelwert des z-Wertes über 1,5 lag. Dabei wurden auch hier nur Werte einbezogen, bei denen die Zellzahl pro *well* mindestens 150 betrug. Positive z-Werte bedeuten eine erhöhte, negative Werte eine verminderte Myc-Proteinexpression verglichen mit dem Mittelwert aller Myc-Signalintensitäten der jeweiligen 96-*well*-Platte.

ID-Nummer	Symbol	z-Wert Screen 1	z-Wert Screen 2	Mittelwert z-Wert
NM_014216	ITPK1	3,68	3,37	3,53
NM_004579	MAP4K2	3,11	2,95	3,03
NM_004336	BUB1	2,67	2,96	2,81
NM_003668	MAPKAPK5	2,78	2,78	2,78
NM_001929	DGUOK	2,52	2,33	2,43
NM_004560	ROR2	2,35	2,50	2,42
NM_003551	NME5	3,39	1,16	2,27
NM_020439	CAMK1G	2,47	1,89	2,18
NM_007181	MAP4K1	2,63	1,63	2,13
NM_002020	FLT4	1,74	2,48	2,11
NM_001320	CSNK2B	1,56	2,66	2,11
NM_016507	CRK7	2,63	1,55	2,09
NM_002731	PRKACB	1,68	2,43	2,05
NM_004383	CSK	2,60	1,48	2,04
NM_005965	MYLK	1,25	2,79	2,02
NM_001433	ERN1	2,42	1,51	1,96
NM_002744	PRKCZ	1,24	2,62	1,93
XM_055866	LMTK3	2,46	1,38	1,92
NM_004834	MAP4K4	2,38	1,25	1,82
NM_001895	CSNK2A1	1,92	1,54	1,73
NM_173598	KSR2	1,85	1,61	1,73
NM_002611	PDK2	0,96	2,45	1,71
NM_004586	RPS6KA3	1,16	2,24	1,70
NM_033550	TP53RK	1,77	1,61	1,69
NM_025194	ITPKC	1,34	1,96	1,65
NM_001364	DLG2	1,84	1,40	1,62
NM_006915	RP2	1,85	1,39	1,62
NM_006622	PLK2	0,92	2,18	1,55
NM_002401	MAP3K3	1,54	1,52	1,53
NM_001824	CKM	1,74	1,29	1,51
NM_003844	TNFRSF10A	-1,60	-1,40	-1,50
NM_000706	AVPR1A	-1,92	-1,18	-1,55
NM_001262	CDKN2C	-1,84	-1,42	-1,63
NM_018890	RAC1	-1,30	-2,00	-1,65
XM_290796	KIAA1361	-1,49	-1,82	-1,65
NM_006068	TLR6	-1,70	-1,62	-1,66
NM_006609	MAP3K2	-1,67	-1,69	-1,68

XM_290516	HSMDPKIN	-1,95	-1,54	-1,75
NM_020185	DUSP22	-2,35	-1,48	-1,91
NM_022048	CSNK1G1	-2,20	-1,64	-1,92
NM_002649	PIK3CG	-2,59	-1,33	-1,96
NM_012096	APPL	-2,20	-2,59	-2,39
NM_024011	CDC2L2	-2,82	-2,36	-2,59

4.1.4 Verifizierung der *Screens* identifiziert MK5 als Myc-regulierende Kinase

Bei der Kandidatenauswahl zur Verifizierung von Hochdurchsatzanalysen gibt es zwei unterschiedliche Ansätze. Einerseits kann man die Treffer mit den stärksten Effekten analysieren, ohne darauf zu achten, ob sie biologisch verwandt sind oder nicht. Die zweite Möglichkeit besteht darin, die Ergebnislisten nach Treffern mit der gleichen biologischen Funktion und/oder nach bereits beschriebenen Signalwegen zu untersuchen. Nach dieser zweiten Methode wurden auch die Ergebnislisten der RNAi-*Screens* von Birgit Samans (IMT Marburg) analysiert, wobei die Kriterien zur Trefferanalyse nicht so streng waren wie für die Auswahl der oben angegebenen Listen. So wurden beispielsweise auch Kinasen aus *wells* berücksichtigt, deren Zellzahl unter 150 lagen und deren z-Wert im Mittel geringer war als in Tabelle 1 oder 2 angegeben. Zur Analyse wurde die Datenbank IPA(*Ingenuity Pathway Analysis*; Ingenuity Systems, Inc; Redwood City, Californien) verwendet. Diese Datenbank enthält publizierte Informationen und Verknüpfungen von Proteinen und deren Signalwege. Gibt man eine Ergebnisliste zur Analyse in die IPA-Datenbank ein, sucht diese nach bereits publizierten Verknüpfungen innerhalb der Treffer und erstellt dann eine Liste mit Netzwerken. So wurden für die RNAi-*Screens* unter anderem folgende Signalwege innerhalb der Ergebnisliste identifiziert: B-Zell-Rezeptor-Signalweg, NF- κ B-Signalweg (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*), IL-6-Signalweg (*interleukin 6*), PTEN-Signalweg (*phosphatase and tensin homolog*), SAPK/JNK-Signalweg (*stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*), PI3K/AKT-Signalweg (*phosphoinositide-3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*) oder auch der MAPK-Signalweg (*mitogen-activated protein kinase*) (Daten nicht gezeigt).

Für die weitere Analyse wurde auf den MAPK-Signalweg im Speziellen fokussiert. Die Treffer innerhalb der beiden Ergebnislisten mit den stärksten Effekten auf die Myc-Proteinmengen wurden dabei zur Validierung ausgesucht (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Trefferliste der RNAi-Screens für die weitere Validierung

Die Ergebnislisten der beiden RNAi-Screens wurden einer IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*)-Analyse unterzogen. Aus dem identifizierten Netzwerk (MAPK-Signalweg) wurden die Treffer mit den stärksten Effekten auf die Myc-Proteinexpression für die weitere Analyse ausgewählt.

ID-Nummer	Symbol	Screen	Mittelwert z-Wert
NM_004834	MAP4K4	siRNA	1,82
NM_004579	MAP4K2	siRNA	3,03
NM_007181	MAP4K1	siRNA	2,13
NM_002401	MAP3K3	siRNA	1,53
NM_002401	MAPK13	shRNA	2,71
NM_003668	MAPKAPK5	siRNA	2,78

Es wurde untersucht, welchen Einfluss diese sechs Kinasen auf die Regulation der Myc-Proteinexpression ausüben. Dafür wurden U2OS-Zellen ausgewählt, die im Gegensatz zur Zelllinie aus dem *Screen Myc* ausschließlich endogen exprimierten. Die Zellen wurden mit siRNAs, die gegen die Kinasen gerichtet waren, transfiziert und 72 Stunden später geerntet. Mittels qRT-PCR wurde für jede Kinase die Depletionseffizienz ermittelt (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde mittels Immunoblot festgestellt, ob die Depletion der jeweiligen Kinase die Myc-Proteinexpression erhöhte (Daten nicht gezeigt). In mehreren unabhängigen Versuchen konnten die stärksten und die reproduzierbarsten Effekte durch die Depletion der Kinase MK5 (MAPKAPK5 = *MAP kinase-activated protein kinase 5*, PRAK = *p38-regulated/activated kinase*) erzielt werden. Im Weiteren wurde daher auf die Kinase MK5 fokussiert und analysiert, über welchen Mechanismus sie die Myc-Proteinexpression reguliert.

4.2 MK5 reguliert die MYC-Translation über miR-34b/c

4.2.1 MK5 reguliert die Myc-Proteinexpression

Eine Depletion von *MK5* führte sowohl im *Screen* als auch bei der Validierung der Ergebnisse zum Anstieg der Myc-Proteinexpression. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt Zelltyp- und Zelllinien-unabhängig ist, wurden Tumorzelllinien unterschiedlicher Gewebeherkunft getestet: U2OS (humane Osteosarkomzellen), HeLa (humane Zervixkarzinomzellen) und HCT116 (humane Kolonkarzinomzellen). Die Zellen wurden transient mit si*MK5* transfiziert und die Proteinexpression von MK5 und Myc nach 72 Stunden bestimmt (Abb. 7A). Zusätzlich wurden eine Kontroll-siRNA- und eine *mock*-Transfektion durchgeführt, bei der zwar das Transfektionsreagenz, aber keine siRNA verwendet wurde. Die Depletion von MK5 führte in allen drei Zelllinien zu einem Anstieg der endogenen Myc-Proteinexpression, während die Kontroll-siRNA-Transfektion verglichen mit der *mock*-Transfektion keinen Einfluss auf die Myc-Proteinmenge zeigte. Somit erfolgt die Regulation der Myc-Proteinexpression durch MK5 Zelltyp-unabhängig.

Um zu testen, ob die Überexpression von *MK5* zu einer Verminderung der Myc-Proteinexpression führt, wurden HeLa-Zellen transient mit *MK5*-Expressionsplasmiden transfiziert. Dazu wurden nicht nur Expressionplasmide mit dem wildtyp-*MK5*-Gen, sondern auch eine Kinase-inaktive Mutante (K51M) und zwei MK5-Mutanten mit einer konstitutiven Kinaseaktivität (T182D, L337G) hergestellt. Die Aminosäuresubstitutionen und die Effekte auf die MK5-Kinaseaktivität waren bereits beschrieben (Seternes et al., 2002). Die exogene Expression der konstitutiv-aktiven Mutante von MK5 führte zu einer Reduktion der Myc-Proteinmenge (Abb. 7B). Die Kinase-inaktive Mutante MK5K51M zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Myc-Proteinexpression, was darauf hinweist, dass die Kinaseaktivität von MK5 für die Regulation der Myc-Proteinexpression notwendig ist.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die durch MK5 verminderte Myc-Expression das Wachstumsverhalten der Zellen veränderte. Dazu wurden U2OS-Zellen stabil mit einem Expressionsplasmid, das für die konstitutiv-aktive MK5L337G-Mutante kodiert, infiziert. Die Wachstumskurve zeigt, dass die MK5L337G-exprimierenden Zellen eine reduzierte Proliferationsgeschwindigkeit aufwiesen (Abb. 7C). Dies wurde durch eine Kristallviolett-Färbung bestätigt (Abb. 7D).

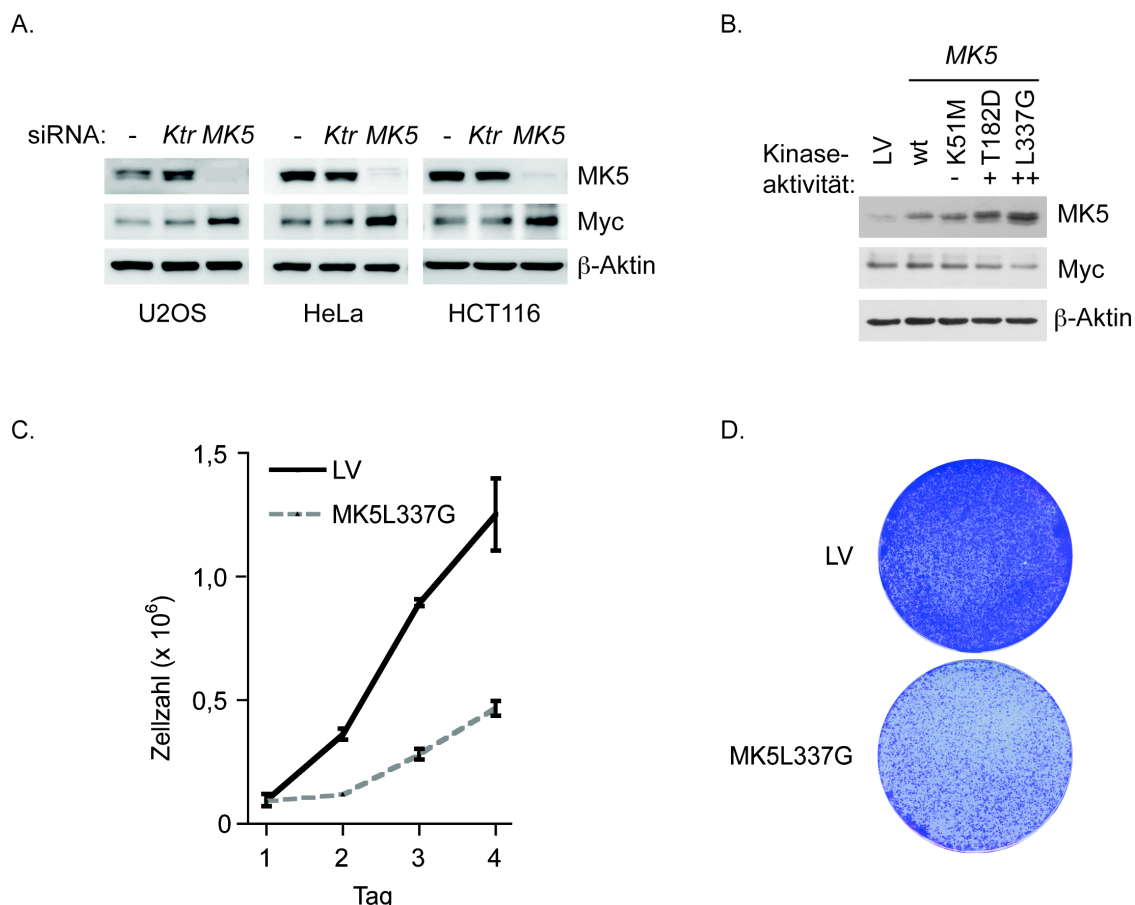


Abbildung 7: MK5 reguliert die Myc-Proteinmenge und die Zellproliferation.

- (A) *siMK5* reguliert die Myc-Proteinexpression Zelltyp-unabhängig. Drei Tumorzelllinien aus verschiedenen Geweben (U2OS = Osteosarkom, HeLa = Zervixkarzinom, HCT116 = Kolonkarzinom) wurden mit *siMK5* bzw. einer Kontroll-siRNA (*siKtr*) transfiziert und 72 Stunden später geerntet. Zusätzlich wurde eine mock-Transfektion durchgeführt, bei der zwar das Transfektionsreagenz, aber keine siRNA verwendet wurde. Die Proteinexpression von MK5 und Myc wurde mit den angegebenen Antikörpern nachgewiesen. β -Aktin diene als Ladekontrolle.
- (B) Die Überexpression des *MK5*-Gens reduziert die Myc-Proteinexpression. HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen *MK5*-Expressionsplasmiden transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Proteinexpression von MK5 und Myc mittels Immunoblot detektiert.
- (C) Aktives MK5L337G reprimiert das Wachstum von U2OS-Zellen. U2OS-Zellen wurden retroviral mit einem Expressionsvektor für die konstitutiv-aktive MK5L337G-Mutante bzw. mit dem Leervektor (LV) infiziert. Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zellen in gleicher Zellzahl ausplattiert und vier Tage lang die Zunahme der Zellzahl in technischen Triplikaten gezählt.
- (D) MK5L337G supprimiert die Koloniebildung. Die in (C) beschriebenen Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausplattiert und nach 7 Tagen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

MK5 wurde sowohl im *Screen* als auch in den bisher beschriebenen Versuchen durch Transfektion eines Gemisches aus vier siRNA-Sequenzen (*Pool*) depletiert. Um unspezifische Nebeneffekte (*off-target effects*) dieses Gemisches auszuschließen, wurden U2OS-Zellen separat mit allen vier einzelnen siRNA-Sequenzen (a – d) bzw. erneut mit dem *Pool* transfiziert. Sowohl alle vier Einzelsequenzen als auch das Gemisch führten zu einer reduzierten MK5-Proteinexpression. Die Myc-Proteinexpression war bei allen Transfektionen erhöht (Abb. 8A). Somit erhöht die Transfektion von *siMK5* die Myc-

Proteinexpression nicht durch einen unspezifischen Nebeneffekt des *siMK5-Pools*. Für alle weiteren Versuche wurde daher weiterhin das Gemisch aus vier Sequenzen verwendet.

Mit einer weiteren Methode zum Ausschluss von sequenzunspezifischen Nebeneffekten der *siMK5*-Transfektion sollte überprüft werden, ob eine Ko-Expression von *siMK5* und eines *siMK5*-resistenten *MK5*-Expressionsplasmids die Myc-Proteinexpression beeinflusst. Dazu wurden vier Nukleotide in der Zielsequenz der *siMK5-d* innerhalb des *MK5*-Gens (siehe Abbildung 8A) mutiert, ohne dabei die Aminosäuresequenz von *MK5* zu verändern. Die Transfektion von *siMK5* führte in HeLa-Zellen zur gesteigerten Myc-Proteinmenge, was durch Überexpression der *siMK5*-resistenten *MK5L337G*-Mutante verhindert werden konnte (Abb. 8B). Zudem verminderte die Überexpression von *MK5L337G*, wie schon in Abb. 7B zu sehen, die Myc-Proteinexpression. Diese Daten bestätigen, dass es sich bei der *siMK5*-vermittelten Regulation der Myc-Proteinexpression nicht um einen sequenzunspezifischen Nebeneffekt handelt.

Eine weitere Möglichkeit der Depletion einer mRNA stellt die Vektor-basierte Expression von shRNAs dar. U2OS-Zellen wurden retroviral mit zwei verschiedenen shRNA-Vektoren zur Depletion von *MK5* infiziert und anschließend selektioniert. Auch die shRNA-vermittelte Depletion von *MK5* erhöhte die Myc-Proteinexpression (Abb. 8C).

4.2.2 *MK5* reguliert nicht die *MYC*-mRNA-Expression

Eine erhöhte Proteinexpression kann durch transkriptionelle oder post-transkriptionelle Regulation erfolgen. Im Hochdurchsatz-Screen wurde Myc unter Kontrolle des retroviralen LTR exprimiert, um transkriptionelle Effekte der Myc-Regulation auszuschließen. Zur Validierung von *MK5* als Kinase, die die Myc-Proteinexpression reguliert, wurden jedoch in allen drei verwendeten Zelllinien (U2OS, HeLa, HCT116) die Effekte auf die endogene Myc-Proteinexpression gemessen. Es konnte also nicht von vorne herein ausgeschlossen werden, dass die gesteigerte Myc-Proteinexpression durch transkriptionelle Effekte erfolgte. Daher wurde die *MYC*-mRNA-Expression in *MK5*-depletierten Zellen bestimmt. Weder bei der Transfektion von siRNAs (Abb. 8D) noch bei der Infektion mit shRNA-Vektoren (Abb. 8E) führte die Depletion von *MK5* zu einem Anstieg der *MYC*-mRNA-Expression. Somit konnte eine transkriptionelle Regulation der Myc-Expression sowie eine erhöhte *MYC*-mRNA-Stabilität nach *MK5*-Depletion ausgeschlossen werden.

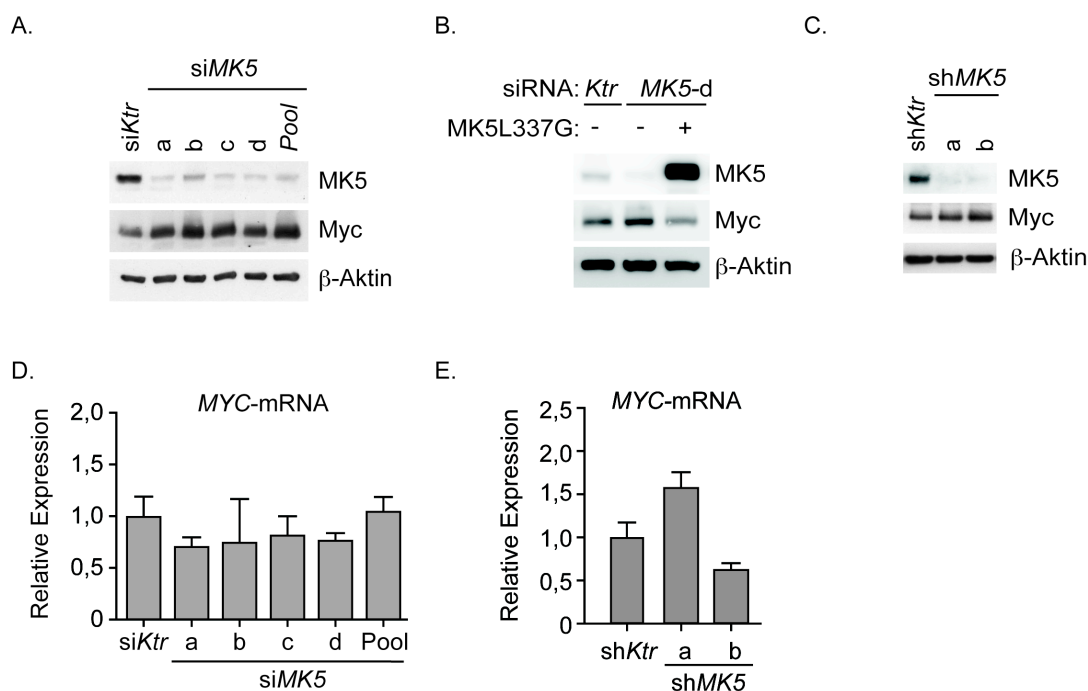


Abbildung 8: siMK5 erhöht die Myc-Proteinmenge, beeinflusst aber nicht die MYC-mRNA-Expression.

- (A) Die siMK5-Transfektion erhöht die Myc-Proteinexpression. U2OS-Zellen wurden mit einem Gemisch aus vier siRNA-Sequenzen (*Pool*) oder mit den jeweiligen einzelnen Sequenzen (a – d) transfiziert und nach 72 Stunden für Immunoblots geerntet. Die Proteinexpression wurde mit den angegebenen Antikörpern detektiert.
- (B) siMK5-d-resistentes MK5L337G hebt die siMK5-vermittelte Myc-Regulation auf. HeLa-Zellen wurden mit siMK5-d und gegebenenfalls mit dem Expressionsvektor für die siMK5-d-resistente MK5L337G-Mutante ko-transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und die Myc- bzw. die MK5-Proteinmengen mittels Immunoblot bestimmt.
- (C) shMK5 steigert die Myc-Proteinexpression. U2OS-Zellen wurden retroviral mit einem Kontroll-shRNA-Vektor (shKtr) oder zwei verschiedenen shRNA-Vektoren zur Depletion von MK5 (a, b) infiziert. Puromycin-resistente Zellen wurden zwei Tage nach der Selektion geerntet und die Proteinmengen von MK5, Myc und β -Aktin bestimmt.
- (D) siMK5 erhöht nicht die MYC-mRNA-Expression. Aus den in (A) beschriebenen Zellen wurde RNA isoliert und die Expression der MYC-mRNA mittels qRT-PCR-Analyse bestimmt. *RPS14* diente als Referenzgen.
- (E) shMK5 steigert nicht die MYC-mRNA-Expression. Die in (C) beschriebenen Zellen wurden mittels qRT-PCR auf die MYC-mRNA-Expression untersucht.

4.2.3 siMK5 erhöht die MYC-Translation durch Reduktion von miR-34b/c

Es gibt mehrere Arten der post-transkriptionellen Proteinregulation. Die Phosphorylierung von Zielproteinen dient häufig als Erkennungssignal für Enzyme wie Ubiquitinligasen, die dann über die Proteinmodifizierung und den Proteinabbau deren Halbwertszeit regulieren. Um zu testen, ob MK5 die Myc-Proteinstabilität beeinflusst, wurden HeLa-Zellen mit Kontroll-siRNA oder mit siMK5 transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurde Cycloheximid (CHX) zu den Zellen gegeben. Dieser Translationsinhibitor blockiert die

Proteinneusynthese und ermöglicht es somit, die Abbaugeschwindigkeit von Proteinen zu bestimmen. Wie bereits zuvor beschrieben, war die Myc-Proteinexpression nach *MK5*-Depletion erhöht (Abb. 9A, 0h-Wert). Der Myc-Abbau erfolgte jedoch in Kontrollzellen und in *MK5*-depletierten Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit (Abb. 9A, B). Die Quantifizierung ergab in Kontroll-Zellen eine Myc-Halbwertszeit von 57,4 Minuten, in *MK5*-depletierten Zellen von 56,0 Minuten (Abb. 9B). Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Myc-Stabilität nach *MK5*-Depletion festgestellt.

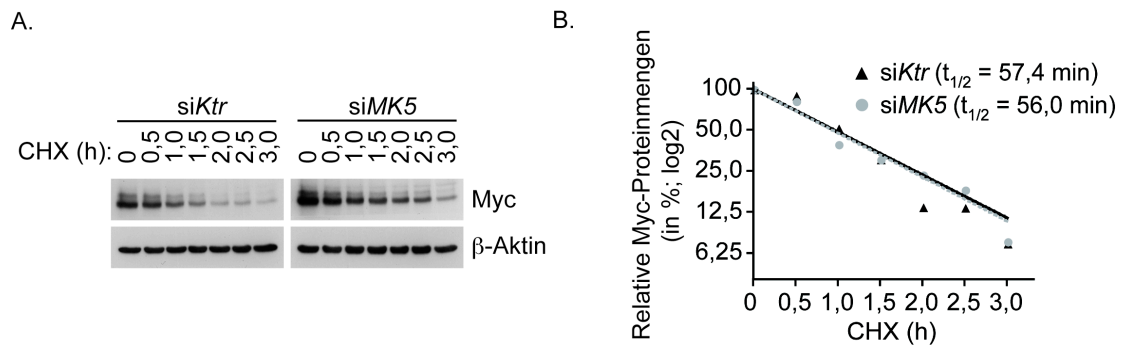


Abbildung 9: siMK5 beeinflusst nicht die Myc-Halbwertszeit.

- (A) *siMK5* hat keinen Einfluss auf die Myc-Halbwertszeit. HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (*siKtr*) oder mit *siMK5* transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Cycloheximid (CHX; 100 μ g/ml) inkubiert, um die Proteinneusynthese zu hemmen, und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Bestimmung der Myc-Proteinmenge erfolgte mittels Immunoblot.
- (B) Quantifizierung der Myc-Halbwertszeit. Die densitometrische Quantifizierung des Immunoblots von (A) zeigt den Abbau des Myc-Proteins. Hierbei wurde auf β -Aktin normalisiert. Die exponentielle Regression ergibt in der logarithmischen Auftragung eine Gerade und diente zur Berechnung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$ in min).

Durch eine post-transkriptionelle Proteinmodifikation oder auch durch die Beeinflussung der DNA-Bindungsstärke kann die Löslichkeit bzw. die Extrahierbarkeit von Proteinen beeinflusst werden. Um zu überprüfen, ob eine *MK5*-Depletion die Extrahierbarkeit des Myc-Proteins steigert, wurden *siMK5*-transfizierte Zellen mit zwei unterschiedlichen Extraktionspuffern lysiert. Es wurden hierbei sowohl der lösliche Überstand als auch die DNA-gebundenen Proteine der *Pellet*-Fraktion mittels Immunoblot auf die Myc-Proteinexpression untersucht. Hierdurch konnte bestimmt werden, bei welcher Lysemethode sich welcher Anteil von Myc im unlöslichen *Pellet* befindet. Einerseits wurde ein milder, hypotoner Lysepuffer verwendet, der geringe Mengen an Salz, aber keine Detergenzien enthält und somit zum Anschwellen und Platzen der Zellen führt. Hierdurch finden sich nur leicht extrahierbare Proteine im Überstand, während DNA-gebundene Proteine wie beispielsweise der Myc-Transkriptionsfaktor im *Pellet* verbleiben

und somit normalerweise verworfen werden (Abb. 10, links). Der RIPA-Lysepuffer enthält mehrere verschiedene Detergenzien, was auch die Extraktion von stärker DNA-assoziierten Proteinen wie Myc ermöglicht (Abb. 10, rechts). Die Lyse von *MK5*-depletierten Zellen führte aber mit beiden Extraktionspuffern zu einem Anstieg der Myc-Proteinmenge (Abb. 10). Bei der hypotonen Lyse fand sich Myc zwar in der unlöslichen *Pellet*-Fraktion, aber die Myc-Proteinmenge war wie im RIPA-Lysat nach *siMK5*-Transfektion deutlich gesteigert. Somit ist die gesteigerte Myc-Proteinexpression in *MK5*-depletierten Zellen nicht auf eine unvollständige Extraktion durch erhöhte Unlöslichkeit des Proteins zurückzuführen.

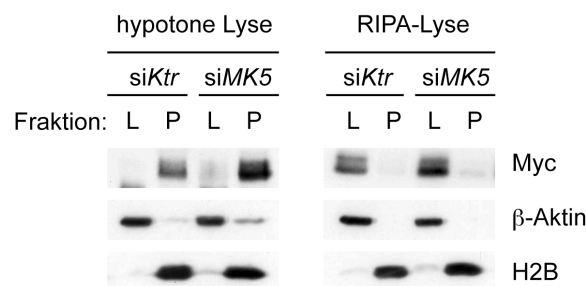


Abbildung 10: *siMK5* beeinflusst nicht die Extrahierbarkeit von Myc.

HeLa-Zellen wurden mit *siKtr* oder *siMK5* transfiziert und drei Tage nach der Transfektion geerntet. Die Zellen wurden entweder mit hypotonem Lysepuffer (links) oder mit RIPA-Puffer (rechts) lysiert. Sowohl der lösliche Überstand (L) als auch das unlösliche *Pellet* (P) wurden mittels Immunoblot auf die Myc-Proteinmengen untersucht. β-Aktin diente als Ladekontrolle für leicht extrahierbare Proteine, während das DNA-gebundene Histon H2B als schwer extrahierbares Protein gewählt wurde.

Neben der Protein-Halbwertszeit und der mRNA-Stabilität stellt die Beeinflussung der Translation eine weitere Möglichkeit der post-transkriptionellen Regulation der Proteinexpression dar. Zur Messung der Translationsrate wurden HeLa-Zellen zwei Tage nach *MK5*-Depletion für 15 Stunden mit Methionin-freiem Medium inkubiert. Durch Zugabe von radioaktiv-markiertem ^{35}S -Methionin wurden anschließend neu-synthetisierte Proteine markiert. Die Zellen wurden nach 60-minütiger Inkubation geerntet, lysiert und anhand einer Szintillationsmessung gleiche Mengen an radioaktiv-markierten Proteinen für eine Myc-Immunpräzipitation eingesetzt. Das Präzipitat wurde über eine Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel getrocknet und mittels Autoradiographie ein Röntgenfilm belichtet und entwickelt. Dieses Experiment ergab, dass die Translation von *MYC* in *MK5*-depletierten Zellen gesteigert war, während die Translation anderer Proteine (gekennzeichnet durch Sternchen) nicht beeinflusst war (Abb. 11A). Diese Daten belegen, dass die *MK5*-Depletion nicht die Myc-Proteinstabilität, sondern die *MYC*-Translation erhöht.

Die Translation von mRNA wird über mehrere Mechanismen reguliert. Hierbei spielen sowohl die 5'-untranslatierte Region (UTR) als auch das 3'-UTR eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden mehrere *MYC*-Expressionsvektoren hergestellt (Abb. 11B). Sie enthalten die kodierende Sequenz (*coding sequence*, CDS) und gegebenenfalls zusätzlich die untranslatierte Region am 5'- bzw. am 3'-Ende der mRNA. Diese *MYC*-Konstrukte wurden in einen retroviralen Vektor kloniert und über Infektion in U2OS-Zellen stabil exprimiert. Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zellen mit einer Kontroll-siRNA bzw. si*MYC5* transfiziert. Die Depletion von *MYC5* und deren Auswirkung auf die Myc-Proteinexpression wurde mittels Immunoblot bestimmt (Abb. 11C). Die Depletion von *MYC5* erhöhte die Myc-Proteinexpression von endogenem Myc (Leervektorzellen, LV). Die Expression von *MYC*-Konstrukten, die entweder nur die kodierende Sequenz oder die CDS und das 5'-UTR enthielten, führte zur starken Myc-Proteinexpression, die durch Depletion von *MYC5* aber nicht gesteigert wurde. Die Expression von *MYC*-Konstrukten mit 3'-UTR führte zu einer milden Myc-Überexpression, die durch si*MYC5* erhöht wurde. Diese Daten zeigen, dass *MYC5* die *MYC*-Translation über das 3'-UTR reguliert.

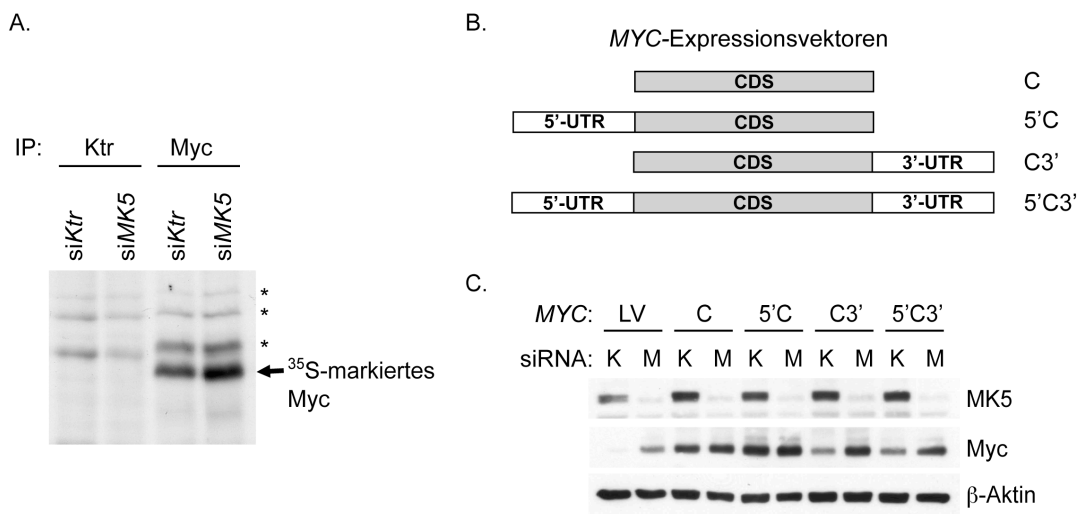


Abbildung 11: si*MYC5* steigert die *MYC*-Translation über das 3'-UTR.

- (A) si*MYC5* steigert die *MYC*-Translationsrate. HeLa-Zellen wurden mit si*MYC5* oder si*Ktr* transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für 15 Stunden in Methionin-freiem Medium kultiviert und danach für 60 Minuten mit ³⁵S-markiertem Methionin inkubiert. Die Lysate wurden mit einem Myc- bzw. einem Kontrollantikörper (Ktr) immunpräzipitiert, die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Ergebnis durch Autoradiographie dokumentiert. Die Sternchen weisen auf unspezifische Banden hin.
- (B) Konstrukte für die *MYC*-Überexpression. Die Expressionsvektoren enthalten, falls angegeben, neben der kodierenden Sequenz (*coding sequence*, CDS, C) zusätzlich die 5'-untranslatierte Region (*untranslated region*, UTR) (5'C) oder das 3'-UTR (C3') oder beide UTRs (5'C3').
- (C) Die Depletion von *MYC5* reguliert *MYC* über das 3'-UTR. U2OS-Zellen wurden retroviral stabil mit den in (B) beschriebenen Expressionsvektoren oder einem Leervektor (LV) infiziert und selektioniert. Die Zellen wurden mit si*MYC5* (M) oder einer Kontroll-siRNA (K) transfiziert und nach 72 Stunden geerntet. Die Lysate wurden mittels Immunoblot auf die Proteinexpression von *MYC5* und Myc untersucht.

Das 3'-UTR der *MYC*-mRNA enthält unter anderem eine Bindestelle für die microRNAs der miR-34-Familie (Kong et al., 2008). Die miR-34-Familie besteht aus drei Mitgliedern: miR-34a, miR-34b und miR-34c. Um zu bestimmen, ob diese miRNAs in den Zellen exprimiert werden und die Myc-Proteinmenge regulieren, wurden U2OS-Zellen mit exogenen miRNAs bzw. mit Depletions-Oligonukleotiden transfiziert (Abb. 12A). Die Transfektion von synthetischen miR-34b- bzw. miR-34c-Oligonukleotiden führte in U2OS-Zellen zu einer Verminderung der Myc-Proteinexpression (Abb. 12A, links). Synthetische Oligonukleotide, die die endogen exprimierten miR-34-Familienmitglieder einzeln depletierten, erhöhten alle die Myc-Proteinexpression (Abb. 12A, rechts). Dies bestätigte, dass die miR-34-vermittelte Regulation der Myc-Proteinexpression in den Zellen funktionell war.

Anschließend sollte geprüft werden, ob MK5 die Expression eines oder mehrerer miR-34-Familienmitglieder regulierte. Dazu wurden Zellen mit si*MK5* transfiziert und anschließend die Expressionsmengen der miRNAs mittels qRT-PCR bestimmt. Die Depletion von *MK5* verminderte die Expression von miR-34b und miR-34c, während die Expression von miR-34a unverändert blieb (Abb. 12B). Zudem führte die Überexpression der konstitutiv-aktiven MK5-Mutante (MK5L337G) zur erhöhten miR-34b/c-Expression (Abb. 12C).

Die Regulation der Myc-Proteinexpression durch si*MK5* ließ sich durch synthetische miR-34b- oder miR-34c-Oligonukleotide aufheben (Abb. 12D). Dazu wurden *MK5*-depletierte Zellen bzw. Kontrollzellen mit miR-34b, miR-34c oder Kontroll-Oligonukleotiden transfiziert und anschließend die Myc-Proteinexpression bestimmt. Wie bereits in Abb. 12A gezeigt, führte die exogene Expression von miR-34b/c zu einer verminderten Myc-Proteinexpression (Vergleich der Bande 1 mit den Banden 3 und 5). Während die Depletion von *MK5* in Kontrollzellen die Myc-Proteinmenge erhöhte, wurde die Myc-Proteinexpression in den miR-34b- bzw. miR-34c-transfizierten Zellen nach Depletion von *MK5* nicht gesteigert (Abb. 12D). Dies bestätigt, dass miR-34b und miR-34c die nach der *MK5*-Depletion regulierten miRNAs sind und dass MK5 die Myc-Proteinexpression über miR-34b und miR-34c beeinflusst.

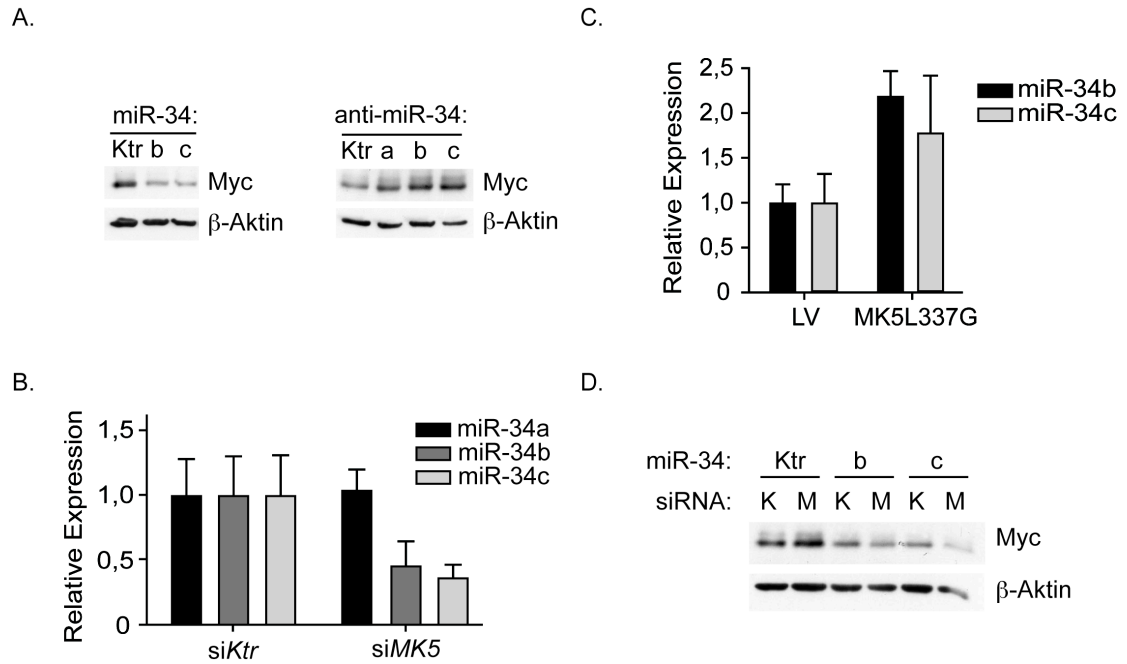


Abbildung 12: MK5 reguliert die MYC-Translation durch die Induktion von miR-34b/c.

- (A) miR-34 microRNAs regulieren die Myc-Proteinexpression. U2OS-Zellen wurden transfiziert mit synthetischen Oligonukleotiden, die die Funktion von miR-34b oder miR-34c nachahmten (links) oder die miR-34a, miR-34b und miR-34c depletierten (rechts). Die Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion geerntet und mittels Immunoblot auf die Myc-Proteinexpression untersucht.
- (B) siMK5 vermindert die Expression von miR-34b/c. HCT116-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (siKtr) oder siMK5 transfiziert und 72 Stunden später für die RNA-Isolation geerntet. Aus der Gesamt-RNA wurde microRNA-spezifische cDNA hergestellt und die Expressionslevel von miR-34a, miR-34b und miR-34c bestimmt. Als Referenzen diente *hsa-snord44*. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert (MW) + Standardabweichung (SD), $n = 3$.
- (C) MK5 induziert die Expression von miR-34b/c. Konstitutiv-aktives MK5 (MK5L337G) wurde in HeLa-Zellen transient exprimiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden. 48 Stunden später wurden Proben für die microRNA-spezifische cDNA-Synthese geerntet. Die Bestimmung der Expressionslevel von miR-34a, miR-34b und miR-34c erfolgte mittels qRT-PCR. Die Daten sind dargestellt als MW + SD, $n = 3$.
- (D) MK5 reguliert die Myc-Proteinexpression über miR-34b und miR-34c. HCT116-Zellen wurden mit synthetischen miR-34b- oder miR-34c-Oligonukleotiden (34b, 34c) oder Kontroll-Oligonukleotiden (Ktr) transfiziert. Die Zellen wurden entweder mit einer Kontroll-siRNA (K) oder siMK5 (M) ko-transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Myc-Proteinmengen im Immunoblot bestimmt.

4.2.4 Depletion von *MK5* erhöht die *MYC*-Translation p53-unabhängig über FoxO Transkriptionsfaktoren

Da es sich bei *MK5* um eine Kinase, nicht aber um einen Transkriptionsfaktor handelt, sollte der Mediator zwischen *MK5* und den miR-34b/c-microRNAs ermittelt werden. Als direkter Transkriptionsfaktor für die Expression aller drei miR-34-Familienmitglieder wurde bereits p53 beschrieben (Bommer et al., 2007; He et al., 2007). Während miR-34a einen eigenen Promotor besitzt, werden miR-34b und miR-34c durch dieselbe pre-miRNA BC021736 exprimiert (He et al., 2007). Zudem wurde p53 bei der Ras-induzierten Seneszenz als direktes Zielprotein von *MK5* beschrieben (Sun et al., 2007). Somit wurde im Folgenden untersucht, ob *MK5* die miR-34b/c-Expression über p53 beeinflusst.

Dazu wurde die Funktion von endogenem p53 in U2OS-Zellen durch Expression eines C-terminalen Fragmentes von p53 (p53DD) inhibiert. Dieses Fragment kann mit p53 und mit den anderen p53-Familienmitgliedern, p63 und p73, oligomerisieren. Da aber die DNA-Bindung und die Transaktivierung der Zielgene unterbunden wird, wirkt es dominant-negativ (Bowman et al., 1996; Shaulian et al., 1992). U2OS-Zellen wurden retroviral mit dem p53DD-Expressionsplasmid infiziert und selektioniert. Diese Zellen zeigen bereits eine erhöhte Myc-Proteinexpression (Abb. 13A), die sich durch eine fehlende p53-abhängige Repression der Myc-Expression erklären lässt. Die Depletion von *MK5* führte sowohl in den Kontroll- als auch in den p53DD-Zellen zu einem etwa 6-fachen Anstieg der Myc-Proteinexpression (Abb. 13A). Die Rolle von p53 wurde auch in HCT116-Kolonkarzinomzellen untersucht. Diese exprimieren wildtyp-p53, wurden aber auch als p53-defiziente Zelllinie etabliert (Bunz et al., 1998). Durch Einbringung von Hygromycin-Resistenzkassetten in den endogenen *TRP53*-Lokus auf beiden Chromosomen wurde in dieser HCT116-p53^{-/-}-Zelllinie die Expression von p53 komplett ausgeschaltet. Vergleichbar mit den p53DD-exprimierenden U2OS-Zellen waren die endogenen Myc-Proteinmengen in den HCT116-p53^{-/-} im Vergleich zu den HCT116-p53^{+/+}-Zellen erhöht (Abb. 13B). Sowohl in den p53-profizienten als auch in den p53-defizienten HCT116-Zellen führte die Depletion von *MK5* zur gesteigerten Myc-Expression (Abb. 13B). Somit wurde in zwei unabhängigen Zelllinien gezeigt, dass *MK5* die Myc-Proteinexpression p53-unabhängig reguliert.

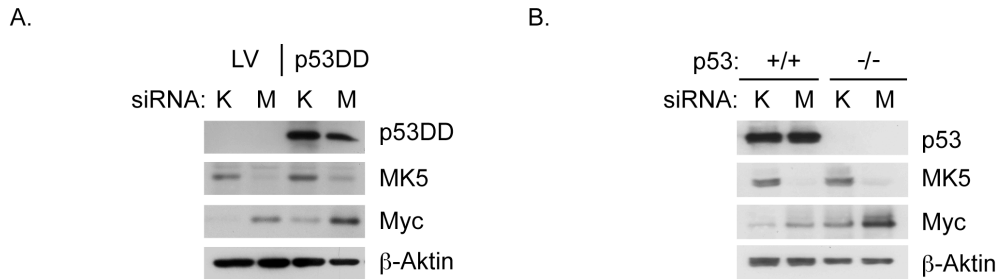


Abbildung 13: p53 ist nicht notwendig für die Regulation der Myc-Proteinexpression durch MK5.

- (A) Dominant-negatives p53 (p53DD) verhindert nicht den Anstieg der Myc-Proteinmenge nach *MK5*-Depletion. U2OS-Zellen wurden retroviral mit einem C-terminalen Fragment von p53, das dominant-negativ wirkt (p53DD), oder dem Leervektor (LV) infiziert. Die Zellen wurden selektioniert und *Pools* entweder mit Kontroll-siRNA (K) oder si*MK5* (M) transfiziert. Die Proteinexpression von p53DD, Myc, MK5 und β-Aktin wurde mittels Immunoblot nachgewiesen.
- (B) p53 ist nicht notwendig für die MK5-vermittelte Regulation der Myc-Proteinexpression. p53-profiziente (+/+) bzw. p53-defiziente (-/-) HCT116-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (K) oder si*MK5* (M) transfiziert und 72 Stunden später geerntet. Proteinlysate wurden auf die Expression von p53, MK5, Myc und β-Aktin analysiert.

Um den Transkriptionsfaktor zu identifizieren, der die Regulation der Myc-Proteinexpression durch MK5 vermittelt, wurde eine Analyse des miR-34b/c-Promotors durchgeführt. Dabei wurden mehrere Konsensus-Bindestellen für die Familie der FoxO-Transkriptionsfaktoren identifiziert (Abb. 14A). Die Konsensus-FoxO-Bindestelle lautet G/ATAAAT/CA (Brunet et al., 1999) bzw. allgemeiner gefasst RYAAAYAW. Die vier identifizierten potentiellen FoxO-Bindestellen innerhalb des miR-34b/c-Promotors befanden sich an den Basenpaarpositionen -185 (GTAAACAA), -1223 (GTAAATAT), -1512 (ATAAACAA) und -1518 (ATAAATAT) stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (Abb. 14A).

Zur Untersuchung einer *in vivo*-Bindung der FoxO-Transkriptionsfaktoren an den miR-34b/c-Promotor wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Hierfür wurde eine Mutante von FoxO3a verwendet, bei der drei Aminosäuren gegen Alanine ausgetauscht wurden: FoxO3a(3A) (siehe auch Abb. 20A). Durch Mutation von Threonin 32, Serin 253 und Serin 315 wurde eine Phosphorylierung durch die Akt-Kinase unterbunden (Brunet et al., 1999). Akt inaktiviert FoxO3a, da die Phosphorylierung von zweien dieser drei Aminosäuren (Threonin 32, Serin 253) die Bindung an das Adapterprotein 14-3-3 induziert. Dadurch wird einerseits der nukleäre Export induziert, andererseits wird FoxO3a im Zytoplasma sequestriert. Die FoxO3a(3A)-Mutante kann

somit verwendet werden, um eine Regulation der Genaktivierung unabhängig von der Aktivität des Akt-Signalweges zu untersuchen.

FoxO3a(3A) wurde zudem als Fusionsprotein exprimiert, wobei es an die Hormonbindedomäne (Aminosäuren 281 bis 599) des murinen Östrogenrezeptors (*estrogen receptor*, ER) fusioniert war: FoxO3aER(3A) (Bouchard et al., 2007). Durch die Mutation G525R innerhalb der Hormonbindedomäne lässt sich FoxO3aER(3A) nur durch Zugabe des synthetischen Östrogenanalogons 4-Hydroxytamoxifen (OHT) aktivieren, nicht aber durch im Zellkulturserum enthaltene Östrogene (Littlewood et al., 1995). Während in der Abwesenheit von OHT das ER-Fusionsprotein durch das Hitzeschockprotein Hsp90 inaktiv gehalten wird, ändert sich nach Zugabe von OHT die Konformation und somit die Aktivität des ER-Fusionsproteins (Eilers et al., 1989).

U2OS-Zellen wurden retroviral mit dem FoxO3aER(3A)-Expressionsplasmid infiziert. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden die Zellen entweder mit OHT zur Aktivierung des Fusionsproteins oder mit Ethanol als Kontrolle inkubiert. Durch Sonifizieren wurde das isolierte Chromatin auf etwa 300 bis 500 Basenpaare lange Fragmente zerkleinert, um eine Unterscheidung der potentiellen FoxO3a-Bindestellen zu ermöglichen. Die Primerpaare für die PCR-Amplifikation der FoxO3a-gebundenen DNA-Bereiche wurden spezifisch für die jeweiligen putativen Bindestellen erstellt, wobei die Bindesequenzen bei -1512 und -1518 gemeinsam analysiert wurden. Als Kontrollregion diente ein DNA-Abschnitt, der sich etwa vier Kilobasenpaare stromabwärts der Transkriptionsstartstelle befand.

Im nicht-aktivierten Zustand war FoxO3aER(3A) an keine der potentiellen Bindestellen stärker gebunden als an die Kontrollregion. Die Zugabe von OHT und somit die Aktivierung von FoxO3aER(3A) induzierte dessen Bindung an die DNA bei -185 und bei -1223 Basenpaaren stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle (Abb. 14B). Die Bindestellen an den Positionen -1512/-1518 sind für die FoxO3a-Bindung an den miR-34b/c Promotor nicht essentiell (Abb. 14B).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die direkte Bindung von FoxO3a an den Promotor für die pre-miRNA BC021736 die Expression von miR-34b/c induziert. Dazu wurden U2OS-Zellen, die das FoxO3aER(3A)-Fusionsprotein stabil exprimierten, mit OHT behandelt. Anschließend wurde die Expression der microRNAs mittels qRT-PCR bestimmt. Die Aktivierung von FoxO3aER(3A) führte zur Induktion der Expression von miR-34b und

miR-34c, aber nicht von miR-34a (Abb. 14C). Diese Daten sind konsistent mit der vorher beschriebenen Induktion von miR-34b/c nach Überexpression von MK5L337G (siehe Abb. 12C). Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass FoxO3a *in vivo* an den miR-34b/c-Promotor bindet und deren Expression induziert.

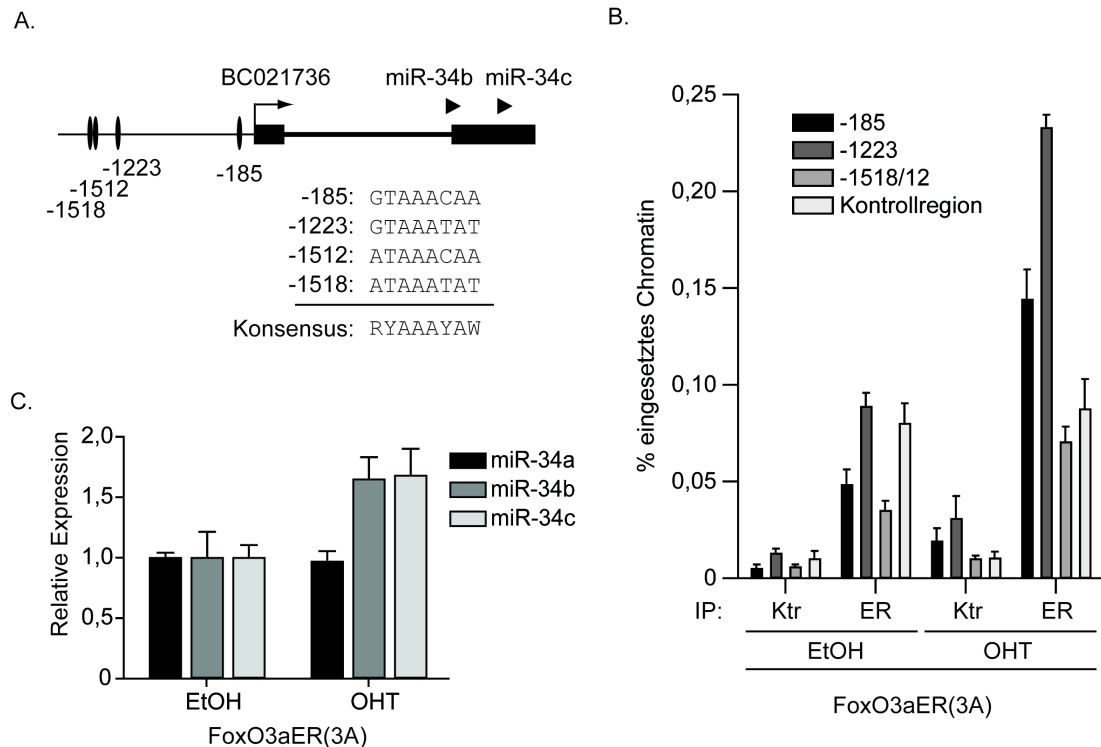


Abbildung 14: FoxO3aER(3A) bindet an den miR-34b/c-Promotor und induziert deren Expression.

- (A) Der miR-34b/c-Promotor enthält Konsensus-Bindestellen für FoxO-Transkriptionsfaktoren. miR-34b und miR-34c werden von einem Primärtranskript kodiert (BC021736). Potentielle FoxO-Bindestellen (gekennzeichnet durch Ellipsen) befinden sich an den Positionen -185, -1223, -1512 und -1518 relativ zum Transkriptionsstart (gekennzeichnet durch den Pfeil).
- (B) FoxO3aER(3A) bindet *in vivo* an den miR-34b/c-Promotor. U2OS-Zellen wurden retroviral mit einem Expressionsplasmid für FoxO3aER(3A) infiziert und selektioniert. Die Zellen wurden mit 4-Hydroxytamoxifen (OHT) behandelt und DNA-gebundene Proteine an die DNA quervernetzt. FoxO3aER(3A) wurde mit einem ER-Antikörper immunpräzipitiert. Als Kontrolle diente ein unspezifisches Immunsereum (Ktr). Die immunpräzipitierten DNA-Fragmente wurden anhand von spezifischen Primern amplifiziert und als % der eingesetzten Chromatinmenge als Mittelwert plus Standardabweichung von Triplikaten dargestellt.
- (C) FoxO3aER(3A) induziert die Expression von miR-34b/c. Die in (B) beschriebenen Zellen wurden für 48 Stunden mit OHT behandelt. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde microRNA-spezifische cDNA hergestellt und die Expression von miR-34a, miR-34b und miR-34c bestimmt. Die Daten sind dargestellt als MW + SD, n = 3.

Anschließend wurde überprüft, ob die Regulation der Myc-Proteinexpression durch MK5 über FoxO-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Dazu wurde die endogene Funktion von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch ein Konstrukt, das dominant-negativ wirkt (dnFoxO), unterdrückt. Dieses Konstrukt kodiert für die hochkonservierte DNA-Bindedomäne von FoxO4 (Medema et al., 2000; van den Heuvel et al., 2005). Dieses dnFoxO-Fragment kann an DNA binden, aber durch Fehlen der Transaktivierungsdomäne keine Zielgene aktivieren, und wirkt dominant-negativ auf alle 4 Mitglieder der humanen FoxO-Familie (Medema et al., 2000; van den Heuvel et al., 2005): FoxO1, FoxO3a, FoxO4 und FoxO6. Stabile Expression des dnFoxO-Konstrukts in U2OS-Zellen führte zum Anstieg der Myc-Proteinexpression (Abb. 15). Dies lässt sich dadurch erklären, dass es die endogene Funktion von FoxO3a hemmt und somit unter anderem die Expression von miR-34b/c reduziert. Durch Depletion von *MK5* wurde die Myc-Proteinexpression aber nicht weiter induziert. Dies steht im Gegensatz zur *MK5*-Depletion in p53-defizienten Zellen (siehe Abb. 13). Hierdurch konnte bestätigt werden, dass MK5 über FoxO-Transkriptionsfaktoren die Expression von miR-34b/c und somit die Translation von *MYC* reguliert.

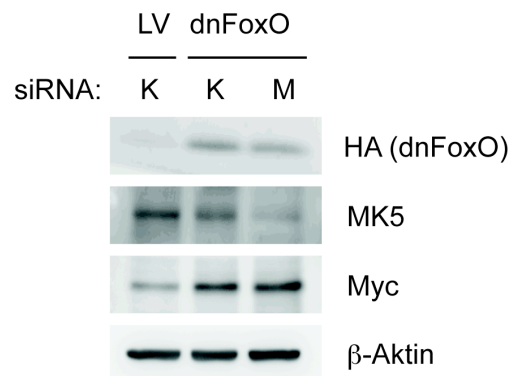


Abbildung 15: dnFoxO blockiert die MK5-induzierte Regulation der Myc-Proteinexpression.

U2OS-Zellen wurden retroviral mit einem Konstrukt für die DNA-Bindedomäne von FoxO4 infiziert. Die Expression dieses Konstrukts (dnFoxO) wirkt dominant-negativ auf alle vier FoxO-Transkriptionsfaktoren. Zur Kontrolle diente eine Infektion des Leervektors (LV). Die Zell-Pools wurden nach Selektion mit Kontroll-siRNA (K) bzw. mit *MK5*-siRNA (M) transfiziert und nach 72 Stunden geerntet. Die Expressionslevel von dnFoxO (HA-markiert), MK5, Myc und β-Aktin wurden mittels Immunoblot bestimmt.

4.3 MK5 phosphoryliert FoxO3a und beeinflusst den FoxO3a-induzierten Wachstumsarrest

4.3.1 MK5 phosphoryliert FoxO3a *in vitro* und *in vivo*

Die Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren wird sehr stark von post-translationalen Regulationsmechanismen wie Acetylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung beeinflusst (Vogt et al., 2005). Einerseits wird FoxO durch Phosphorylierung, wie z.B. durch die Kinase Akt, inaktiviert (siehe Kapitel 4.2.4) (Brunet et al., 1999). Andererseits gibt es FoxO3a-aktivierende Kinasen wie z.B. Mst1 (*mammalian sterile 20-like 1*) (Lehtinen et al., 2006). Daher sollte untersucht werden, ob MK5 die FoxO-Transkriptionsfaktoren direkt phosphorylieren und somit deren transkriptionelle Aktivität am miR-34b/c-Promotor induzieren kann.

Die Phosphorylierungsversuche wurden *in vitro* mit rekombinanter, aktiver MK5-Kinase durchgeführt. Als Substrate dienten bakteriell exprimierte und aufgereinigte FoxO3a-GST-Fusionsproteine. Um Aussagen über die Lokalisation von Phosphorylierungsstellen innerhalb von FoxO3a machen zu können, wurden nicht nur das FoxO3a-Gesamtprotein, sondern auch Deletionsmutanten exprimiert (Abb. 16A). Die Deletionsmutanten enthielten entweder ausschließlich die DNA-Bindedomäne (DBD), die DBD inklusive des N-terminalen Bereichs oder die DBD mit dem C-Terminus inklusive der Transaktivierungsdomäne (TAD). Als Positivkontrolle für den *in vitro*-Kinaseassay diente GST-gekoppeltes Hsp27. Dabei handelt es sich um das Hitzeschockprotein 27, das bereits als Zielprotein der Kinase MK5 beschrieben wurde (Kostenko et al., 2009). Reines GST wurde zur Erkennung von unspezifischer Hintergrund-Phosphorylierung verwendet. Die eingesetzte Menge der Substrate des Kinaseassays wurde durch Coomassie-Färbung visualisiert (Abb. 16B). MK5 phosphorylierte sowohl das bekannte Zielprotein GST-Hsp27 als auch GST-FoxO3a, während GST von MK5 nicht phosphoryliert wurde (Abb. 16C). Außerdem wurden alle weiteren im Kinaseassay eingesetzten FoxO3a-Deletionsmutanten phosphoryliert. Da eines der verwendeten Konstrukte ausschließlich für die DNA-Bindedomäne kodierte und eine starke Phosphorylierung erkennbar war, konnte bereits aus diesem Experiment geschlossen werden, dass mindestens eine Phosphorylierungsstelle innerhalb der DBD lag (Abb. 16C).

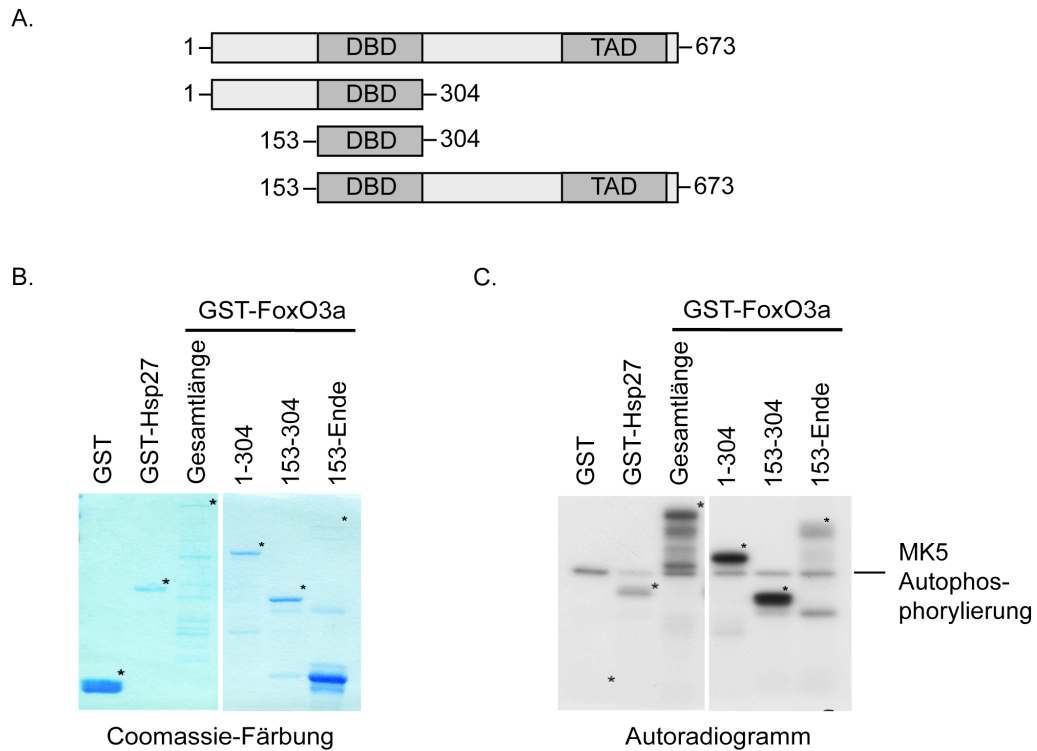


Abbildung 16: MK5 phosphoryliert FoxO3a *in vitro*.

- (A) Konstrukte für die bakterielle Expression von FoxO3a-GST-Fusionsproteinen. Das FoxO3a-Gesamtprotein enthält zwei für die Funktion wichtige Domänen: DNA-Bindedomäne (DBD) und Transaktivierungsdomäne (TAD). Die Expressionsplasmide kodieren entweder für das Gesamtprotein, die DBD, für die DBD inklusive des N-Terminus bzw. für die DBD inklusive des C-Terminus mit TAD.
- (B) GST-Fusionsproteine für den *in vitro*-Kinaseassay. Die in (A) angegebenen Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Durch Coomassie-Färbung wurde die im Kinaseassay eingesetzte Menge bestimmt. Reines GST diente als Negativ-, GST-Hsp27 als Positivkontrolle. Die Sternchen indizieren das jeweilige GST-FoxO-Fusionsprotein.
- (C) MK5 phosphoryliert GST-FoxO3a *in vitro*. Die in (B) beschriebenen GST-Fusionsproteine wurden mit aktiver MK5-Kinase unter Zugabe von γ - 32 P-ATP inkubiert und über SDS-PAGE der Größe nach getrennt. Das Gel wurde getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiogramm bestimmt.

Um die durch MK5 phosphorylierten Aminosäuren von FoxO3a zu bestimmen, wurde der Kinaseassay mit nicht-radioaktivem ATP wiederholt. Die Proben wurden von Arjan Brenkman und Boudewijn Burgering (Universität Utrecht) durch Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, chemisch modifiziert, mit Trypsin verdaut, anschließend über Säulen aufgetrennt und mit einem LTQ Orbitrap-XL Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific) analysiert. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms MASCOT (Matrixscience) auf das Vorhandensein von phosphorylierten Peptiden untersucht. Tabelle 4 zeigt die in der Massenspektrometrie identifizierten phosphorylierten FoxO3a-Peptide. Da die Proben mit Trypsin verdaut wurden, sind die Peptide unterschiedlich lang und enden mit einem Arginin (R) oder einem Lysin (K).

Tabelle 4: Ergebnisliste der durch MK5 phosphorylierten FoxO3a-Peptide

Ein *in vitro*-Kinaseassay mit rekombinanter, aktiver MK5-Kinase und GST-FoxO3a als Substrat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, aus dem Gel geschnitten und nach chemischer Behandlung und Trypsin-Verdau massenspektrometrisch gemessen. Die Daten wurden mit dem Programm MASCOT (Matrixscience) analysiert. Die Tabelle gibt die Positionen der erhaltenen Peptide, der phosphorylierten Aminosäuren (unterstrichen) und die jeweilige Peptidsequenz an.

Aminosäure-Position	Phosphorylierter Rest	Peptid
73-99	S75	AG <u>S</u> AMAIGGGGGSGTLGSGLLLEDSAR
212-219	S215	HNLS <u>L</u> HSR
251-259	S253	AV <u>S</u> MDNSNK
299-310	S299/S300	<u>S</u> SDELDAWTDFR
411-419	S413	SS <u>S</u> FPYTTK
549-569	S551/S553/S555	AL <u>S</u> NSV <u>S</u> NMGLSESSSLGSAK

Da die für die Proteinfunktion wichtigen Bereiche meist evolutionär konserviert sind, wurde weiterhin mit Hilfe des Programms *MegAlign* (DNASTAR Lasergene®) überprüft, ob und welche der *in vitro* phosphorylierten Serine sowohl bei FoxO3a verschiedener Spezies als auch innerhalb der vier humanen FoxO-Proteine (FoxO1, FoxO3a, FoxO4, FoxO6) konserviert vorliegen. Konserviert in FoxO3a bei Mensch (*homo sapiens*), Maus (*mus musculus*), Ratte (*rattus norvegicus*), Wildschwein (*sus scrofa*) und Xenopus (*xenopus laevis*) sind die Serine S215, S253, S299/S300, S551/S555 (Abb. 17C und Daten nicht gezeigt). Konserviert bis zu *sus scrofa*, aber nicht in *xenopus laevis*, sind S7 und S553. Konserviert auch innerhalb der vier Familienmitglieder der humanen FoxO-Familie sind S215 und S253 (Abb. 17C). Eine der Sequenz um S555 ähnlichen Aminosäuresequenz findet sich auch im humanen FoxO1, aber weder in FoxO4 noch in FoxO6 (Abb. 17C). Aufgrund der Sequenzvergleiche und der starken Homologie von S215 und S253 und der Ähnlichkeit von S551/S555 zum bereits bekannten MK5-Zielprotein Hsp27 wurde in der weiteren Analyse auf diese vier Aminosäuren fokussiert. Zudem befand sich an der -1-Position dieser 4 phosphorylierten Aminosäuren, wie auch bei Hsp27, eine der beiden hydrophoben Aminosäuren Valin bzw. Leucin (Abb. 17B).

Ergebnisse

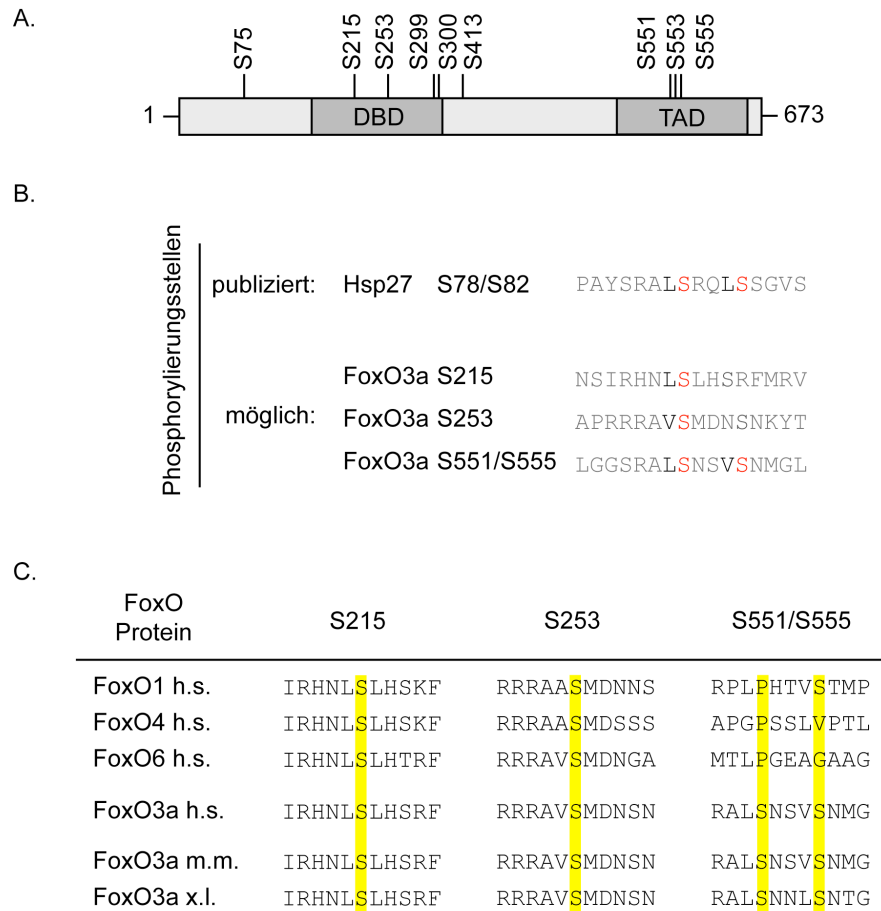


Abbildung 17: Massenspektrometrie identifiziert mehrere putative MK5-induzierte Phosphorylierungsstellen in FoxO3a.

- (A) Lokalisation der phosphorylierten Aminosäuren innerhalb des FoxO3a-Proteins. Die in Tabelle vier aufgelisteten Aminosäuren sind am N-Terminus (S75), in der DNA-Bindedomäne (DBD; S215, S253, S299, S300), in der Proteinmitte (S413) oder in der Transaktivierungsdomäne (TAD; S551, S553, S555) gelegen.
- (B) An -1-Position der putativen Phosphorylierungsstellen befindet sich eine der hydrophoben Aminosäuren Valin (V) bzw. Leucin (L). Dargestellt sind die Positionen und die Aminosäuresequenzen aus dem bekannten MK5-Zielprotein Hsp27 und dem putativen Zielprotein FoxO3a. Die phosphorylierten Reste sind in Rot dargestellt, während die hydrophobe Aminosäure an Position -1 in Schwarz markiert ist.
- (C) S215 und S253 sind hochkonservierte Aminosäuren. Die Peptidsequenzen um die Aminosäuren S215, S253 und S551/S555 von FoxO3a wurden mit Hilfe des Programms MegAlign (DNASTAR Lasergene®) auf die Homologie in verschiedenen Spezies (h.s. = *homo sapiens*, m.m. = *mus musculus*, x.l. = *xenopus laevis*) bzw. innerhalb der humanen FoxO-Familie untersucht. Die phosphorylierten Aminosäuren wurden gelb unterlegt.

Im Folgenden wurde überprüft, welche dieser vier Aminosäuren durch MK5 phosphoryliert wird. Dazu wurden die vier Aminosäuren S215, S253 bzw. S551/S555 einzeln oder in Kombination im GST-FoxO3a-Fusionsprotein zu Alanin mutiert und anschließend für *in vitro*-Kinaseassays eingesetzt. Das Autoradiogramm zeigt, dass die Mutanten FoxO3aS215A bzw. S253A nur noch schwach phosphoryliert wurden (Abb. 18A). Die S551/S555-Doppelmutation führte zu einer milden Reduktion der FoxO3a-

Phosphorylierung (Abb. 18A). Allerdings führte nur die Mutation von allen vier Serinen zu einem nahezu vollständigen Verlust der FoxO3a-Phosphorylierung (Abb. 18A). Dieser Kinaseassay deutet darauf hin, dass es sich bei S215 um die am stärksten phosphorylierte Aminosäure handelt. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Harmjan Vos und Boudewijn Burgering (Universität Utrecht) für Serin 215 ein Phospho-Epitop-spezifisches Immuneserum hergestellt. Dazu wurden Kaninchen mit einem synthetischen, an S215 phosphorylierten Peptid immunisiert. Das Immuneserum nach der zweiten Immunisierung wurde im Immunoblot eingesetzt, um eine *in vivo*-Phosphorylierung zu detektieren. Da das Immuneserum phosphoryliertes S215 im Gesamtzelllysat nicht erkannte (Daten nicht gezeigt), wurde FoxO3a in einer Immunpräzipitation angereichert und das Präzipitat mittels Immunoblot auf die Phosphorylierung untersucht. Dazu wurde in HeLa-Zellen wildtyp-FoxO3a bzw. die FoxO3aS215A-Mutante und, wo angegeben, zusätzlich die konstitutiv-aktive MK5L337G-Mutante exprimiert. Dabei ergab die Immunpräzipitation, dass MK5 wildtyp-FoxO3a, aber nicht FoxO3aS215A phosphorylierte (Abb. 18B). Weiterhin führte die Aktivierung von wildtyp-FoxO3a durch MK5 zu einer Reduktion der Myc-Proteinexpression, während diese Regulation durch Expression von FoxO3aS215A nicht vorlag (Abb. 18B). Dies bestätigt, dass S215 *in vitro* und *in vivo* durch MK5 phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung für die MK5-induzierte Regulation der Myc-Proteinexpression notwendig ist.

Um zu überprüfen, ob MK5 die DNA-Bindung von FoxO3a an den miR-34b/c-Promotor induziert, wurden wildtyp-FoxO3a und MK5L337G ko-exprimiert und mittels einer Chromatin-Immunpräzipitation die Bindung von FoxO3a an den miR-34b/c-Promotor untersucht. Aktives MK5 induzierte die FoxO3a-Bindung an die in Abb. 14B beschriebenen Bindestellen -185 und -1223 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (Abb. 18C). Die erhöhte Bindung war nicht durch eine gesteigerte FoxO3a-Expression bzw. -Stabilität nach Ko-Expression von MK5L337G verursacht, was durch die gleiche Expressionsstärke im Immunoblot bestätigt wurde (Abb. 18D).

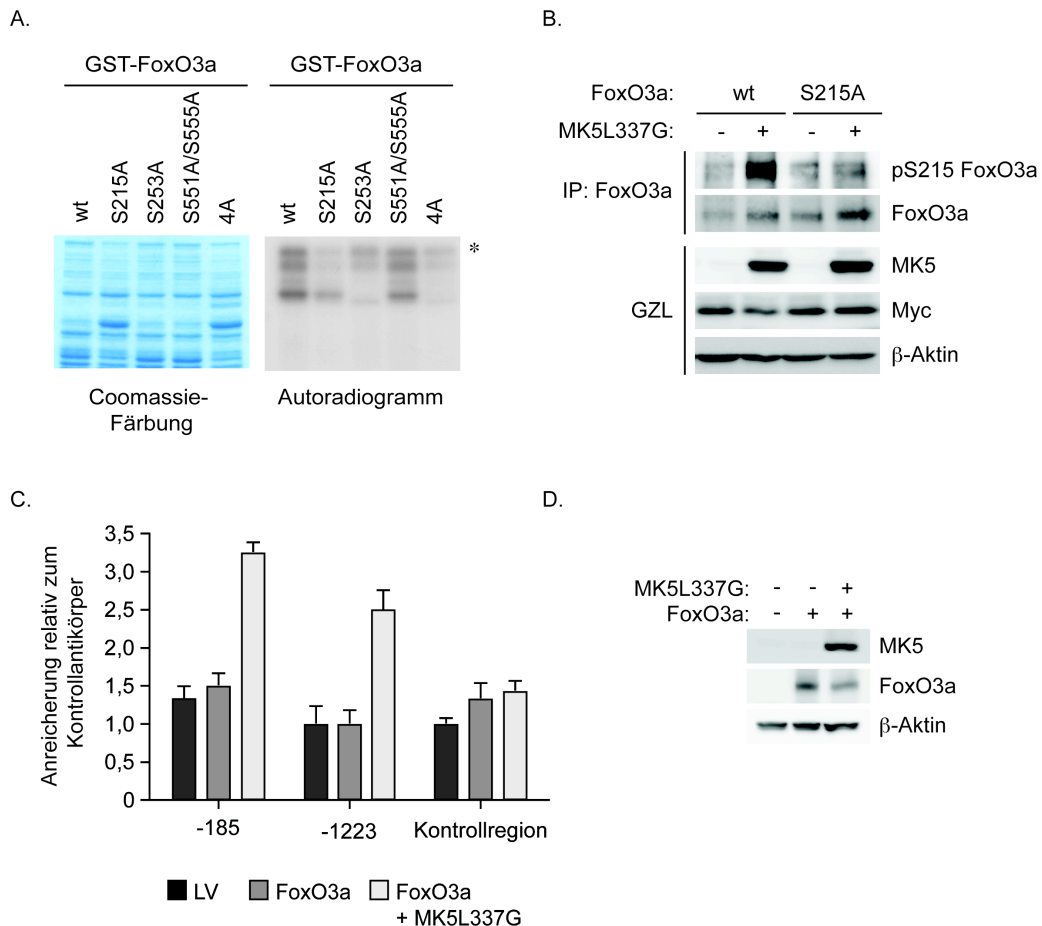


Abbildung 18: Aktives MK5 phosphoryliert FoxO3a an S215 *in vitro* und *in vivo* und induziert die FoxO3a-DNA-Bindung.

- (A) MK5 phosphoryliert FoxO3a *in vitro* an mehreren Serinen. GST-FoxO3a wurde bakteriell als wildtyp-Protein (wt), als S215A, S253A, bzw. S551A/S555A-Mutante oder als eine Kombination dieser vier SA-Mutationen (4A) exprimiert. Die für den *in vitro*-Kinaseassay eingesetzten Proteine wurde mittels Coomassie-Blau-Färbung visualisiert (links). Die Phosphorylierungsstärke wurde durch ein Autoradiogramm der Proben bestimmt (rechts). Das Sternchen kennzeichnet die FoxO3a-Bande der erwarteten Größe.
- (B) MK5L337G phosphoryliert FoxO3a an Serin 215 *in vivo*. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für wildtyp-FoxO3a bzw. für die FoxO3aS215A-Mutante und, sofern angegeben, für MK5L337G transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet. FoxO3a wurde immunpräzipitiert und auf die Gesamtexpression bzw. auf die Phosphorylierung an S215 mittels Immunoblot untersucht. Das Gesamtzelllysate (GZL) wurde auf die Proteinexpression von MK5, Myc und β-Aktin untersucht.
- (C) MK5L337G induziert die DNA-Bindung von FoxO3a. HeLa-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für FoxO3a, MK5L337G und/oder dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und die DNA-Bindung von FoxO3a an die Bindestellen des miR-34b/c-Promotors durch PCR bestimmt. Dabei wurden Primer für die Bindestellen -185 und -1223 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle bzw. für eine Kontrollregion verwendet.
- (D) Die in (C) beschriebenen Zellen wurden mittels Immunoblot auf die Proteinexpression von MK5 und FoxO3a untersucht.

4.3.2 MK5 induziert die nukleäre FoxO3a-Akkumulation durch Phosphorylierung an Serin 215

Mst1, eine durch oxidativen Stress induzierte Kinase, phosphoryliert FoxO3a an Serin 209 und induziert so dessen nukleäre Lokalisation (Lehtinen et al., 2006). Da sich Serin 209 und Serin 215 innerhalb derselben α -Helix von FoxO3a befinden, sollte überprüft werden, ob auch die Phosphorylierung an S215 durch MK5 zu einer Veränderung der FoxO3a-Lokalisierung führt. Wildtyp-FoxO3a bzw. die FoxO3aS215A-Mutante wurde mit konstitutiv-aktivem MK5L337G in HeLa-Zellen ko-exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation von FoxO3a wurde mittels Immunfluoreszenz und anschließender Quantifizierung bestimmt. Dabei waren sowohl wildtyp-FoxO3a als auch FoxO3aS215A zu etwa 85% ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert. Die Ko-Expression von MK5L337G führte zu einer nukleären Akkumulation von wildtyp-FoxO3a in etwa 40% der Zellen, während bei FoxO3aS215A keine Änderung der Lokalisation durch Ko-Expression von MK5L337G zu beobachten war (Abb. 19A).

Eine Inhibierung des PI3-Kinase-Signalwegs führt ebenfalls zu einer nukleären FoxO3a-Lokalisation (siehe Abschnitt 4.2.4) (Brunet et al., 1999). Daher wurden FoxO3a- und MK5L337G-überexprimierende Zellen mit dem PI3K-Inhibitor BEZ235 behandelt und die Lokalisation von FoxO3a untersucht. Wildtyp-FoxO3a war nach 30 Minuten BEZ235-Inkubation teilweise im Zytoplasma und stark im Zellkern lokalisiert (Abb. 19B). Wurde zusätzlich MK5L337G exprimiert, war wildtyp-FoxO3a bereits nach 30-minütiger Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor BEZ235 ausschließlich im Kern lokalisiert, was erneut bestätigte, dass MK5 die nukleäre Akkumulation von FoxO3a induzieren konnte. FoxO3a215A war auch nach Inhibition durch BEZ235 stark zytoplasmatisch lokalisiert, was sich durch Ko-Expression von MK5L337G nicht änderte (Abb. 19B). Somit konnte gezeigt werden, dass MK5 durch Phosphorylierung von Serin 215 die nukleäre Akkumulation von FoxO3a induziert.

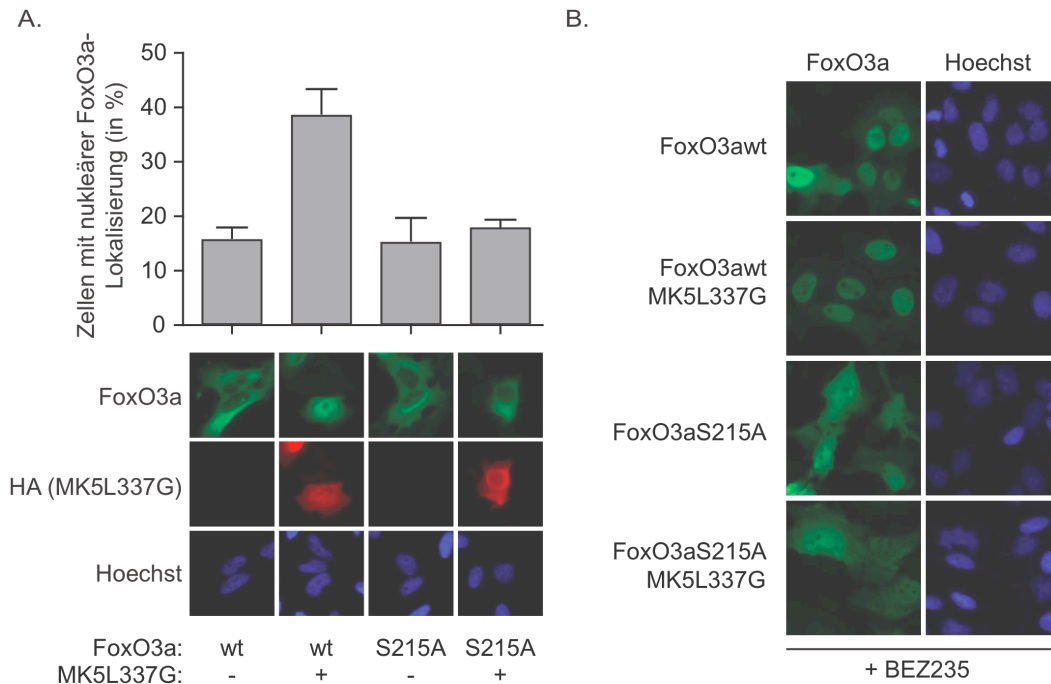


Abbildung 19: Aktives MK5 induziert die nukleäre FoxO3a-Lokalisation.

- (A) MK5L337G induziert die nukleäre Lokalisation von wildtyp-FoxO3a (FoxO3awt). HeLa-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für wildtyp-FoxO3a (wt) bzw. für die FoxO3aS215A-Mutante (S215A) und gegebenenfalls zusätzlich für konstitutiv-aktives MK5L337G transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert und die subzelluläre Lokalisation von FoxO3a durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt. Der Anteil der Zellen mit nukleärer FoxO3a-Färbung wurde ausgezählt und als MW + SD (n = 3) angegeben. Dabei wurden pro Zählung mindestens 100 Zellen berücksichtigt.
- (B) FoxO3aS215A akkumuliert nach PI3-Kinase-Inhibition nicht im Zellkern. Die in (A) beschriebenen Zellen wurden für 30 Minuten mit dem PI3K-Inhibitor BEZ235 behandelt und die FoxO3a-Lokalisation durch Immunfluoreszenz ermittelt.

4.3.3 Nicht durch MK5 phosphorylierbares FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der miR-34b/c-Induktion und der MYC-Regulation

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die Phosphorylierung von MK5 die zellulären Funktionen von FoxO3a reguliert. Dazu wurden die vier MK5-phosphorylierten Serine in FoxO3a zu Alanin mutiert: S215, S253, S551, S555 (siehe Abb.18A). Die Mutationen wurden in das FoxO3aER(3A)-Fusionsprotein eingebracht, um die Experimente unabhängig von Einflüssen des PI3K-Akt-Signalwegs durchführen zu können (siehe Abschnitt 4.2.4). Da in der FoxO3aER(3A)-Mutante bereits Serin 253 durch Alanin ausgetauscht war, wurden die drei weiteren MK5-phosphorylierten Serine S215, S551 und S555 durch Alanin ersetzt, wodurch das FoxO3aER(6A)-Fusionsprotein entstand (Abb. 20A).

Zunächst sollte die Lokalisation dieses Fusionsproteins bestimmt werden. Dazu wurden U2OS-Zellen retroviral mit den Expressionsplasmiden für die FoxO3aER(3A)- bzw. die FoxO3aER(6A)-Mutante infiziert. Die Zellen wurden selektioniert und Zell-Pools für die weiteren Experimente eingesetzt. Sowohl FoxO3aER(3A) als auch FoxO3aER(6A) waren in der Abwesenheit von OHT sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (Abb. 20B). Nach Zugabe von OHT relokalisierte FoxO3aER(3A) vollständig in den Zellkern, während FoxO3aER(6A) teilweise im Zytoplasma verblieb. Somit regulierte die MK5-vermittelte Phosphorylierung von FoxO3a dessen subzelluläre Lokalisation. Diese Beobachtung bestätigte, was bereits mit wildtyp-FoxO3a und der FoxO3aS215A-Mutante demonstriert werden konnte (siehe Abb. 19A).

Weiterhin sollte die DNA-Bindung der FoxO3aER(6A)-Mutante untersucht werden. Dazu wurden die U2OS-Zellen mit OHT inkubiert und nach dem Ernten mittels einer Chromatin-Immunpräzipitation die DNA-Bindefähigkeit an die Konsensus-FoxO-Bindestellen im miR-34b/c-Promotor überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die FoxO3aER(6A)-Mutante in der *in vivo*-DNA-Bindung an den Promotor des BC021736-Primärtranskripts beeinträchtigt war (Abb. 20C; verglichen mit Abb. 14B). Diese Daten deuten darauf hin, dass neben der subzellulären Lokalisierung auch die DNA-Bindung von FoxO3a an den miR-34b/c-Promotor durch MK5 reguliert wird (siehe auch Abb. 18C).

Um zu überprüfen, ob die Einführung von drei zusätzlichen Alanin-Mutationen in das FoxO3aER(3A)-Fusionsprotein Auswirkungen auf die Struktur des Proteins hatte oder eventuell zur Fehlfaltung und somit zum Verlust aller Funktionen führte, wurde die Repression von FoxO3a-Zielgenen untersucht. Sie findet ohne direkte FoxO3a-DNA-Bindung statt (Ramaswamy et al., 2002) und ermöglicht es somit, die FoxO3a-Funktionsfähigkeit unabhängig von der DNA-Bindungsstärke zu überprüfen.

CCND1, was für das Cyclin D1-Protein kodiert, ist ein FoxO3a-reprimiertes Gen (Ramaswamy et al., 2002). Die Aktivierung der FoxO3aER(3A)-Mutante in U2OS-Zellen durch Zugabe von OHT reprimierte die *CCND1*-mRNA-Expression (Abb. 20D). Auch FoxO3aER(6A) reprimierte die Expression von *CCND1*, was darauf schließen lässt, dass die FoxO3aER(6A)-Mutante nicht komplett funktional inaktiv ist. Die Repression erfolgte aber langsamer und schwächer als bei FoxO3aER(3A), was sich durch die teilweise zytoplasmatische Retention der FoxO3aER(6A)-Mutante erklären lässt (siehe Abb. 20B).

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass MK5 sowohl die FoxO3a-Lokalisierung als auch die DNA-Bindefähigkeit beeinflusst. Weiterhin entstanden die beobachteten Effekte der FoxO3aER(6A)-Mutante nicht durch Fehlfaltung des Proteins und somit nicht durch völligen Funktionsverlust.

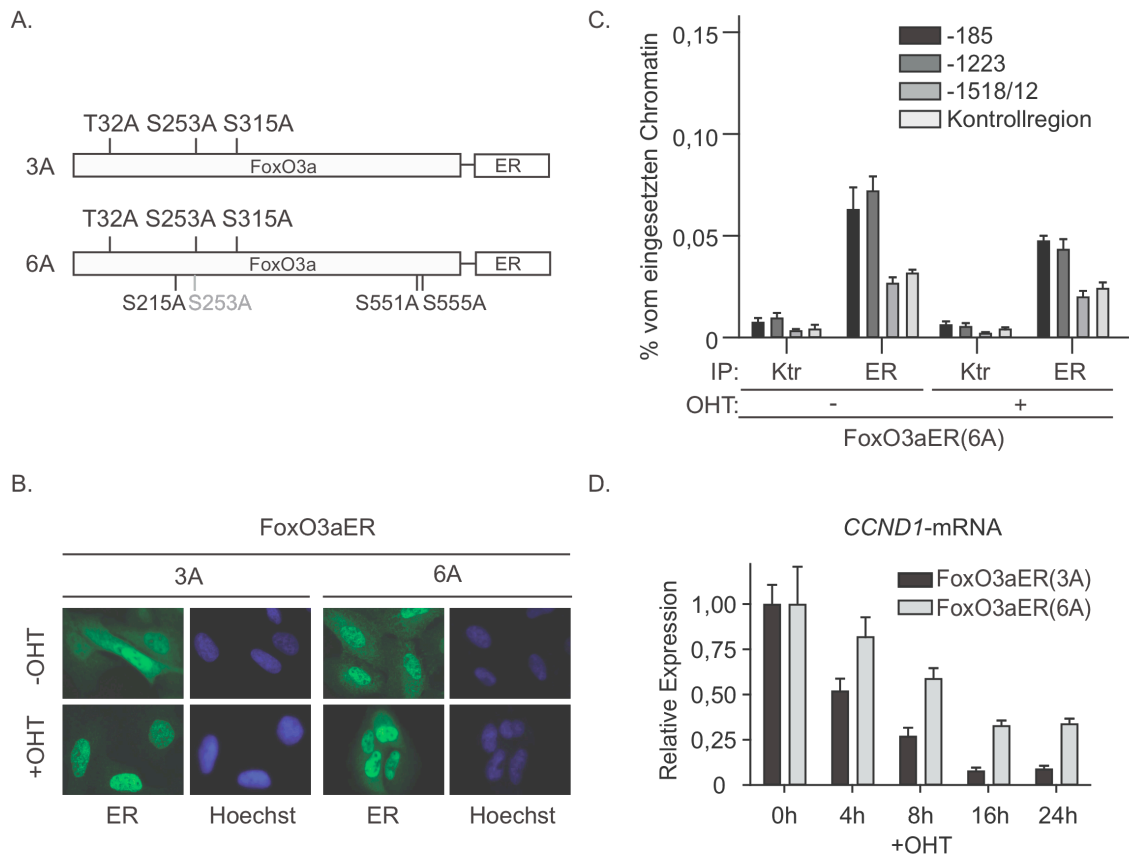


Abbildung 20: FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der nukleären Lokalisierung und der DNA-Bindung.

- (A) Die FoxO3aER(6A)-Mutante dient als ein MK5-Phosphorylierungs-defizientes FoxO3a. Ausgehend von der FoxO3aER(3A)-Mutante, bei der die Akt-phosphorylierten Aminosäuren (T32, S253, S315) durch Alanin ersetzt wurden, wurden drei zusätzliche Mutationen eingefügt: S215A, S551A und S555A. Da Serin 253 (grau) bereits in FoxO3aER(3A) mutiert war, entstand die FoxO3aER(6A)-Mutante.
- (B) Aktives FoxO3aER(6A) ist teilweise zytoplasmatisch lokalisiert. FoxO3aER(3A) und FoxO3aER(6A) wurden durch retrovirale Infektion von U2OS-Zellen exprimiert und stabile Zell-Pools für die weitere Analyse verwendet. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit OHT behandelt, mit Paraformaldehyd fixiert und die FoxO3aER-Lokalisation durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt.
- (C) FoxO3aER(6A) bindet *in vivo* nicht an den miR-34b/c-Promotor. Die in (B) beschriebenen FoxO3aER(6A)-Zellen wurden mit OHT behandelt und für eine Chromatin-Immunpräzipitation geerntet. FoxO3aER(6A) wurde mit einem anti-ER-Antikörper immunpräzipitiert. Kaninchen IgG-Immunserum diente als Kontrolle (Ktr). Präzipitierte DNA-Fragmente wurden amplifiziert mit Oligonukleotiden spezifisch für die FoxO3a-Bindestellen aus Abb. 14B oder einer Kontrollregion. Die Daten sind dargestellt als mittlerer Prozentsatz der in der Chromatin-Immunpräzipitation eingesetzten DNA + SD (n = 3).
- (D) FoxO3aER(6A) reprimiert die *CCND1*-mRNA-Expression schwächer als FoxO3aER(3A). Die in (B) beschriebenen Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit OHT behandelt. Die Zellen wurden geerntet, Gesamt-RNA extrahiert und cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von *CCND1* wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte + SD (n = 3) dargestellt.

Die Aktivierung von FoxO3aER(3A) induziert die Expression von miR-34b/c (siehe Abb. 14C). Um zu überprüfen, ob die MK5-Phosphorylierungs-defiziente FoxO3aER(6A)-Mutante diese Fähigkeit verliert, wurden sowohl die FoxO3aER(3A)- als auch die FoxO3aER(6A)-Mutante in U2OS-Zellen stabil exprimiert. Die Aktivierung von FoxO3aER(3A) induzierte die Expression von miR-34b und miR-34c, aber nicht miR-34a (Abb. 21, siehe auch Abb. 14C). Im Gegensatz dazu induzierte die FoxO3aER(6A)-Mutante keines der drei Familien-mitglieder der miR-34-Familie (Abb. 21). Dies bestätigte, dass die Phosphorylierung von FoxO3a durch MK5 für die Induktion der miR-34b/c-Expression notwendig ist.

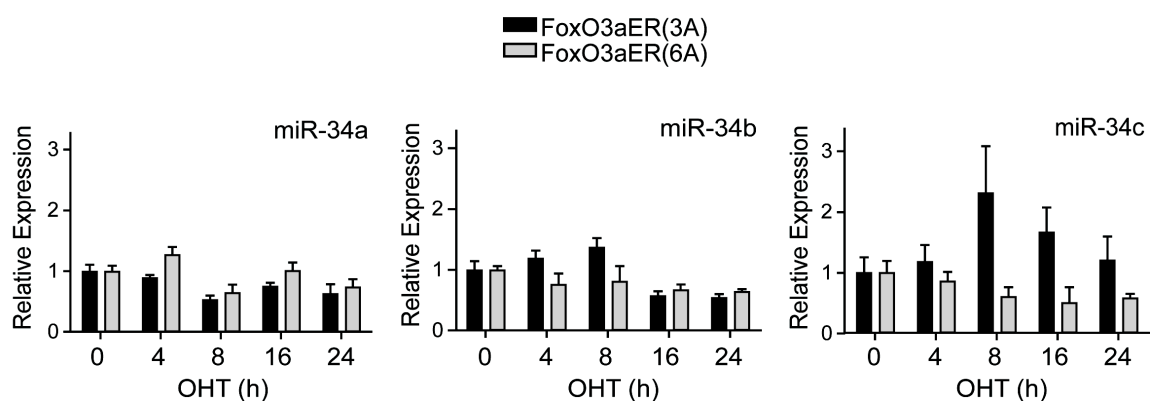


Abbildung 21: FoxO3aER(6A) induziert nicht die miR-34b/c-Expression.

U2OS-Zellen wurden retroviral zur stabilen Expression von FoxO3aER(3A) bzw. FoxO3aER(6A) infiziert. Die Zellen wurden nach Selektion zur Aktivierung des Fusionsproteins mit 4-Hydroxytamoxifen (OHT) behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach Extraktion der Gesamt-RNA wurde microRNA-spezifische cDNA hergestellt und die Expression von miR-34a, miR-34b und miR-34c durch qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind dargestellt als MW + SD (n = 3).

Im Folgenden sollte festgestellt werden, ob die fehlende miR-34b/c-Induktion nach Aktivierung von FoxO3aER(6A) zu einer beeinträchtigten Myc-Regulation führte. Dazu wurden die bereits beschriebenen U2OS-Zellen für verschiedene Zeitspannen mit OHT behandelt, um FoxO3aER(3A) bzw. FoxO3aER(6A) zu aktivieren. Bei der Aktivierung von FoxO3aER(3A) war die Myc-Proteinexpression bereits innerhalb von acht Stunden nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 22A). Im Gegensatz dazu erfolgt die Abnahme der Myc-Proteinexpression durch die FoxO3aER(6A)-Mutante langsamer und schwächer. Auch in der Induktion von p27, einem FoxO3a-induzierten Protein, war die FoxO3aER(6A)-Mutante beeinträchtigt (Abb. 22A). Dass trotz gleicher Expressionslevel beider FoxO3aER-Fusionsproteine nur die FoxO3aER(3A)-Mutante die Myc-Proteinexpression regulierte, deutet darauf hin, dass für die FoxO3a-induzierte Regulation

der Myc-Proteinexpression die Phosphorylierung und die Aktivierung durch MK5 notwendig ist.

Um zu überprüfen, ob die Myc-Proteinexpression nach Aktivierung von FoxO3aER(3A) über die Induktion von miR-34b/c und deren Bindung an das 3'-UTR der *MYC*-mRNA herunterreguliert wird, wurde die *MYC*-mRNA exogen exprimiert. Dabei wurden zwei verschiedene *MYC*-Konstrukte verwendet (siehe Abb. 11B). Zusätzlich zur kodierenden Sequenz (CDS) alleine wurde die *MYC*-mRNA mit 3'-UTR exprimiert. Endogenes Myc wurde durch Aktivierung von FoxO3aER(3A) reprimiert (Leervektorzellen, Abb. 22B). FoxO3aER(3A) konnte die Myc-Proteinexpression, wenn sie ausschließlich durch das CDS kodiert wurde, nicht vermindern (Abb. 22B). Im Gegensatz dazu wurde die Myc-Proteinexpression, wenn sie exogen durch die *MYC*-mRNA 3'-UTR exprimiert wurde, durch FoxO3aER(3A) reguliert (Abb. 22B). Dies deutet darauf hin, dass FoxO3a die Myc-Proteinexpression über miR-34b/c und das 3'-UTR der *MYC*-mRNA reguliert.

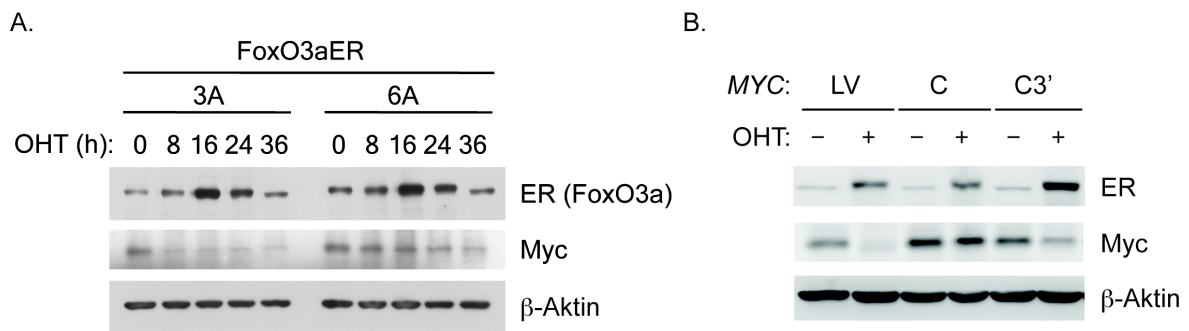


Abbildung 22: FoxO3a reguliert die Myc-Proteinexpression über miR-34b/c und das 3'-UTR der *MYC*-mRNA.

- (A) FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der Repression der Myc-Proteinexpression. U2OS-Zellen wurden retroviral zur stabilen Expression von FoxO3aER(3A) bzw. FoxO3aER(6A) transduziert. Die Zellen wurden mit 4-Hydroxy-tamoxifen (OHT) behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Proteinexpression wurde mittels Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern detektiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle.
- (B) FoxO3aER(3A) reprimiert die Myc-Proteinexpression über das 3'-UTR der *MYC*-mRNA. Die in (A) beschriebenen FoxO3aER(3A)-Zellen wurden retroviral superinfiziert mit Expressionsplasmiden für die *MYC*-mRNA. Diese bestanden aus der kodierenden Sequenz (CDS) ohne (C) bzw. mit (3'C) 3'-UTR (siehe auch Abb. 11B). Die Zellen wurden mit OHT behandelt und nach 24 Stunden für Immunoblots geerntet.

4.3.4 FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der Wachstumshemmung

Die Aktivierung von FoxO3aER(3A) induziert einen Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus in transformierten und nicht-transformierten Zelllinien (Medema et al., 2000; Ramaswamy et al., 2002). Auch in U2OS-Zellen wird das Wachstum nach Zugabe von OHT durch Aktivierung von FoxO3aER(3A) gehemmt, was durch Kristallviolett-Färbung bestätigt wurde (Abb. 23A). Die Wachstumshemmung war nach Aktivierung von FoxO3aER(6A) abgemildert (Abb. 23A). Die genaue Zellzyklusanalyse ergab, dass die FoxO3aER(3A)-Zellen nach Aktivierung in der G1-Phase arretierten (siehe auch (Medema et al., 2000; Ramaswamy et al., 2002)). Bereits nach 16 Stunden OHT-Behandlung befanden sich etwa 80% der Zellen im G1-Arrest (Abb. 23B). Zum gleichen Zeitpunkt befanden sich nur ca. 55% der aktivierten FoxO3aER(6A)-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Im unbehandelten Zustand unterschied sich der Prozentsatz der Zellen in der G1-Phase nicht signifikant (FoxO3aER(3A): 46,4% *versus* FoxO3aER(6A): 45,2%) (Abb. 23B). Diese Daten belegen, dass die MK5-Phosphorylierungs-defiziente FoxO3aER(6A)-Mutante in der Wachstumshemmung beeinträchtigt ist.

Um zu überprüfen, welche Rolle miR-34b/c und das 3'-UTR der *MYC*-mRNA im FoxO3aER(3A)-induzierten Wachstumsarrest haben, wurden die *MYC*-Konstrukte mit der kodierenden Sequenz mit bzw. ohne 3'-UTR in FoxO3aER(3A)-Zellen exprimiert. Die Expression der beiden *MYC*-Konstrukte änderte den Anteil der nicht-OHT-behandelten Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus nur minimal (Abb. 23C). Der FoxO3aER(3A)-induzierte Wachstumsarrest wurde durch Expression der *MYC*-mRNA ohne 3'-UTR vermindert (56,3% *versus* 67,2%). Wurde das *MYC*-Konstrukt mit 3'-UTR überexprimiert, war der Anteil der Zellen in der G1-Phase nach OHT-Inkubation sogar etwas erhöht im Vergleich zu Zellen mit endogener *MYC*-Expression (Abb. 23C).

Diese Daten zeigen zusammenfassend, dass die Verminderung der Myc-Proteinexpression über das 3'-UTR der *MYC*-mRNA für den FoxO3aER(3A)-induzierten Wachstumsarrest eine entscheidende Rolle spielt.

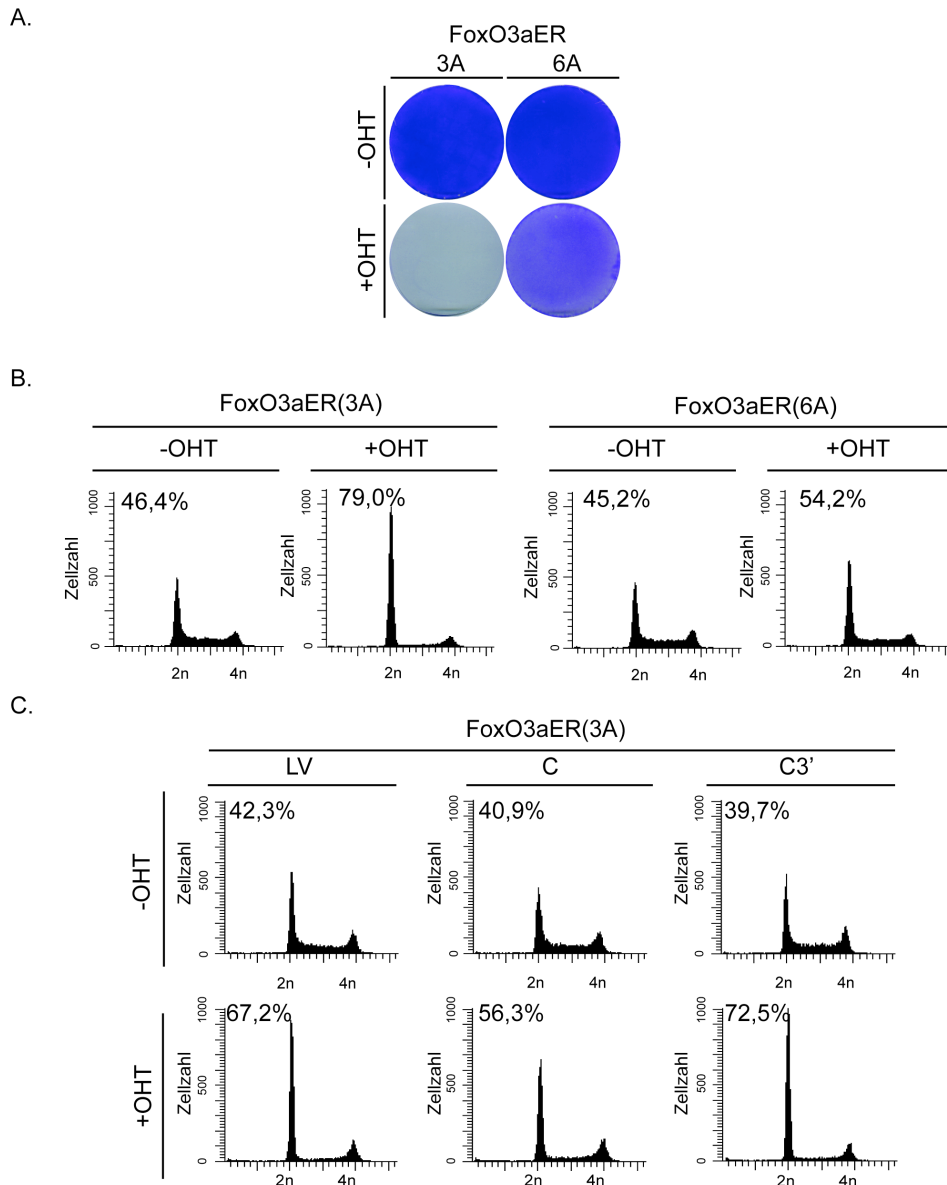


Abbildung 23: FoxO3aER(6A) induziert nur einen schwachen G1-Arrest, während FoxO3aER(3A) über das 3'-UTR der MYC-mRNA das Zellwachstum hemmt.

- (A) FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der Wachstumshemmung. U2OS-Zellen wurden retroviral zur stabilen Expression von FoxO3aER(3A) bzw. FoxO3aER(6A) infiziert. Nach 3-tägiger Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen (OHT) wurden die Zellen auf den Platten fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.
- (B) FoxO3aER(6A) induziert den G1-Arrest schwächer als FoxO3aER(3A). Die in (A) beschriebenen Zellen wurden nach Inkubation mit OHT (16h) fixiert und mit Propidiumiodid für die Zellzyklusanalyse gefärbt. 2n zeigt die Zellen in der G1-Phase, 4n die Zellen in der G2/M-Phase. Die Zahl über dem FACS-Profil gibt den Anteil der Zellen in der G1-Phase an. Die Daten entstanden aus Messung von Triplikaten.
- (C) FoxO3aER(3A) inhibiert das Zellwachstum über das 3'-UTR der MYC-mRNA. Die in Abb. 22B beschriebenen FoxO3aER(3A)-Zellen wurden mit OHT behandelt und nach 16 h Stunden die Zellzyklusverteilung durch ein Propidiumiodid-FACS bestimmt.

4.4 MK5 ist ein direktes Myc-Zielgen

Für die Proteinkinase MK5 wurden mehrere Regulationsmechanismen beschrieben. Der alternative Name PRAK steht für ‚p38-regulierte/aktivierte Kinase‘, da MK5/PRAK ursprünglich als Zielprotein der p38-Proteinkinase beschrieben wurde (New et al., 1998). Auch konstitutiv-aktives Ras führt über den p38-Signalweg zur Aktivierung von MK5 und zur Induktion von Seneszenz (Sun et al., 2007). Als weitere MK5-Aktivatoren wurden in Hefe-2-Hybrid-Analysen die Kinasen Erk3 und Erk4 (*extracellular signal-regulated kinase 3, 4*) identifiziert. Diese führen zur Stabilisierung und zur Aktivierung von MK5 (Aberg et al., 2006; Kant et al., 2006; Schumacher et al., 2004; Seternes et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein weiterer Regulationsmechanismus identifiziert werden. In dem in Abb. 11C dargestellten Experiment fiel auf, dass die exogene Myc-Expression eine erhöhte MK5-Proteinexpression induzierte. Ob die Regulation transkriptionell oder post-transkriptionell stattfand, sollte durch Messung der *MK5*-mRNA-Expressionslevel nach Myc-Aktivierung bestimmt werden. Es wurde ein Zellklon der U2OS-Zelllinie verwendet, der das Myc-Protein als Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne des Östrogenrezeptors (*estrogen receptor*, ER) exprimierte. MycER lässt sich durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen aktivieren und die Induktion bzw. die Repression von Zielgenen untersuchen (Eilers et al., 1989). Die Aktivierung von MycER in den U2OS-Zellen führte zur Induktion der *MK5*-mRNA-Expression (Abb. 24A).

Zudem führte die Depletion von endogenem *MYC* durch siRNA zu einer verminderten MK5-Proteinexpression (Abb. 24B). Auch hier erfolgte die Regulation transkriptionell, da eine verminderte *MK5*-mRNA-Expression vorlag (Abb. 24C).

Nach Serumentzug über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden sinkt die Myc-Expression auf mRNA- und Proteinebene (Kelly et al., 1983). Wenn man die Zellen anschließend durch Serumzugabe stimuliert, erfolgt eine rasche Induktion der *MYC*-mRNA- und der Myc-Proteinexpression. Die mRNA-Expression erreicht das Maximum nach wenigen Stunden und fällt dann wieder ab. In primären Zellen sollte untersucht werden, ob *MK5* nach Serumstimulation ein Myc-Zielgen ist. Während die Expression der *MYC*-mRNA in MCF10A-Zellen (humane primäre Brustepithelzellen) bereits nach zwei Stunden stark induziert war und nach vier Stunden das Plateau erreicht hatte, wurde die Expression der *MK5*-mRNA deutlich langsamer induziert (Abb. 24D). Diese *MK5*-Induktion wurde durch *MYC*-Depletion inhibiert (Abb. 24E). Somit ist *MK5* sowohl bei exogener als auch endogener Myc-Proteinexpression ein Myc-Zielgen.

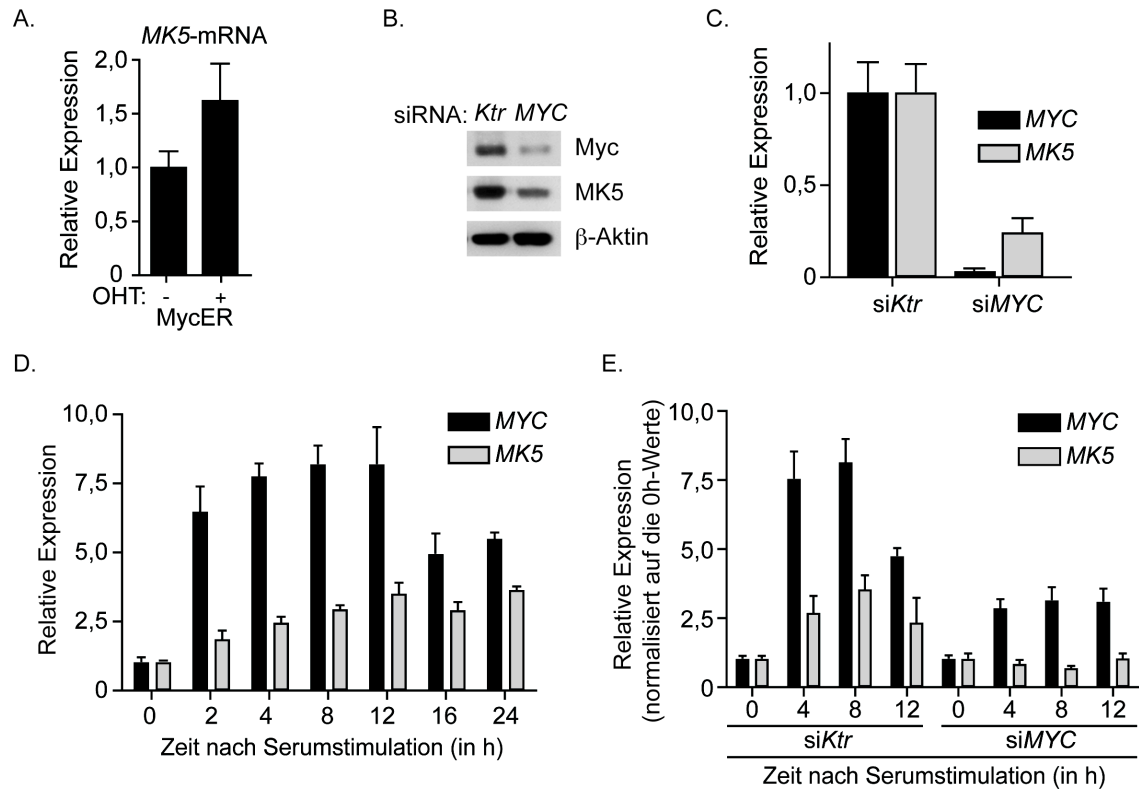


Abbildung 24: Myc reguliert die Transkription der MK5-mRNA.

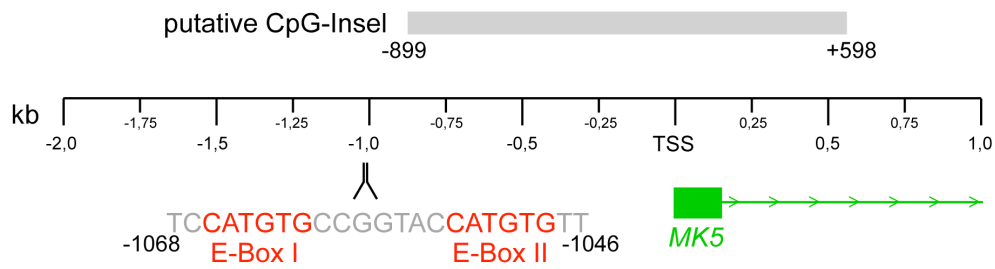
- (A) Aktivierung von Myc induziert die MK5-mRNA-Expression. MycER-exprimierende U2OS-Zellen wurden mit 4-Hydroxytamoxifen (OHT) für 36 Stunden behandelt und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Nach Herstellung von cDNA wurde die MK5-mRNA-Menge durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwert + SD (n = 3) dargestellt.
- (B) MYC-Depletion vermindert die MK5-Proteinexpression. HeLa-Zellen wurden transient mit siMYC oder einer Kontroll-siRNA (siKtr) transfiziert und nach 72 Stunden geerntet. Die Zelllysate wurden auf die Proteinexpression von Myc und MK5 untersucht.
- (C) MYC-Depletion verringert die MK5-mRNA-Menge. Aus den in (B) beschriebenen Zellen wurde cDNA hergestellt und die Expressionslevel der MYC- und der MK5-mRNA durch qRT-PCR als Mittelwert + SD (n = 3) bestimmt.
- (D) Serumstimulation induziert die MYC- und die MK5-mRNA-Expression. MCF10A-Zellen wurden für 48 Stunden in Serum- und Wachstumsfaktor-freiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Vollmedium stimuliert und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Aus Gesamt-RNA wurde cDNA hergestellt und die Expression der MYC- und der MK5-mRNA mittels qRT-PCR bestimmt.
- (E) siMYC hemmt die Induktion von MK5 nach Serumstimulation. MCF10A-Zellen wurden mit siKtr oder siMYC transfiziert und anschließend wie in (D) beschrieben behandelt. Die Expression der MYC- und der MK5-mRNA wurde durch qRT-PCR bestimmt als MW + SD (n = 3). Die Werte wurden relativ zu den jeweiligen 0-Stunden-Werten angegeben.

Daher wurde überprüft, ob Myc die *MK5*-mRNA-Expression durch direkte DNA-Bindung an den *MK5*-Promotor induziert. Das Myc-Protein bindet in der Regel an sogenannte E-Boxen, die der Sequenz CACGTG bzw. allgemeiner CANNTG entsprechen (Blackwell et al., 1990; Blackwood and Eisenman, 1991).

Bei der bioinformatischen Analyse des *MK5*-Promotors wurden ca. 1050 Basenpaare stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle zwei E-Boxen der Sequenz CATGTG identifiziert (Abb. 25A). Weiterhin konnte mit Hilfe des Programms *CpG island searcher* (Takai and Jones, 2003) eine putative CpG-Insel (Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Insel) in der Region um den Transkriptionsstart lokalisiert werden (Abb. 25A und Abschnitt 4.5.4).

Um eine direkte Myc-DNA-Bindung an den *MK5*-Promotor *in vivo* zu überprüfen, wurde aus exponentiell proliferierenden HeLa-Zellen Chromatin isoliert und mit Hilfe von Myc-Antikörpern immunpräzipitiert. Durch Amplifikation der an Myc-gebundenen DNA mit spezifischen Primern für die E-Box-Region bzw. für eine Kontrollregion konnte gezeigt werden, dass das Myc-Protein *in vivo* an den *MK5*-Promotor bindet (Abb. 25B). Dabei war die Bindung an den *MK5*-Promotor sogar stärker als an den *CCND2*-Promotor. Bei *CCND2*, was für Cyclin D2 kodiert, handelt es sich um ein bereits beschriebenes direktes Myc-Zielgen (Bouchard et al., 1999). Die Daten bestätigen, dass Myc *in vivo* an den *MK5*-Promotor bindet und dessen Transkription aktiv reguliert.

A.



B.

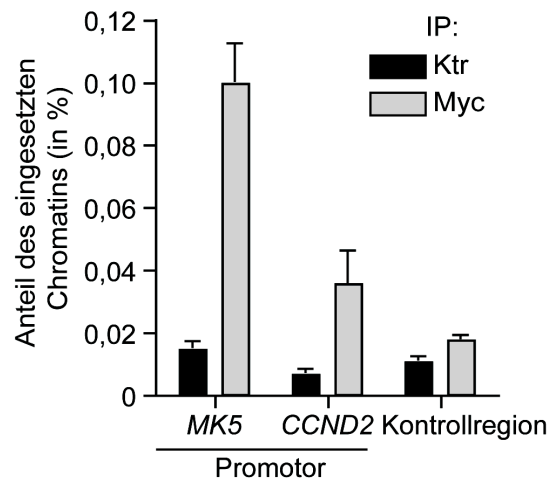


Abbildung 25: Myc bindet direkt an den MK5-Promotor.

- (A) Der MK5-Promotor enthält zwei E-Boxen und eine putative CpG-Insel. Die Sequenz des MK5-Promotors wurde aus der Datenbank des *UCSC Genome Browsers* extrahiert. Zwei E-Boxen sind 1066 bzw. 1053 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (TSS) lokalisiert. Mit Hilfe des Programms *CpG island searcher* (Takai and Jones, 2003) konnte eine putative CpG-Insel von 899 Basenpaaren stromaufwärts bis 598 Basenpaaren stromabwärts des Transkriptionsstarts identifiziert werden.
- (B) Myc bindet an den MK5-Promotor *in vivo*. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurde Chromatin aus HeLa-Zellen eingesetzt. Myc wurde mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert (IP). Ein Kaninchen-IgG-Immunsereum wurde als Kontrolle (Ktr) verwendet. Immunpräzipitierte DNA-Fragmente wurden mit Primern amplifiziert, die spezifisch für die E-Box-Region des MK5-Promotors, des CCND2-Promotors oder für eine Kontrollregion waren. Die Daten sind aufgetragen als MW + SD (n = 3) als Prozentsatz des für den ChIP eingesetzten Chromatins.

Die bisher beschriebenen Daten belegen, dass MK5 durch Phosphorylierung von FoxO3a dessen nukleäre Akkumulation erhöht und die Expression von miR-34b/c induziert. Dies führt zur verminderten Myc-Proteinexpression, was wiederum die MK5-Expression reduziert. Dadurch ergibt sich ein negativer Rückkopplungsmechanismus bestehend aus Myc, MK5, FoxO3a und miR-34b/c.

4.5 Mit fortschreitender Kolontumorgenese wird MK5 zunehmend reprimiert

4.5.1 MK5 ist in gesunden Kolonepithelzellen exprimiert

Im Folgenden wurde untersucht, in welchem biologischen Zusammenhang die MK5-vermittelte Regulation der Myc-Proteinexpression als negativer Rückkopplungsmechanismus eine entscheidende Rolle spielt.

In Zusammenarbeit mit Prof. Andreas Rosenwald (Universität Würzburg) wurde durch immunhistochemische Färbungen von humanen Gewebeschnitten gezeigt, dass MK5 im gesunden Kolonepithelium exprimiert wird (Abb. 26). Dabei war die MK5-Proteinexpression auf die Epithelzellen der Kolonkrypten begrenzt, während das darunterliegende Bindegewebe MK5-negativ war. Die Kryptenbasis, die die Stammzellen enthält, war schwächer gefärbt als die Kryptenmitte (proliferierende Zellen) oder die luminalen, differenzierten Zellen. Es konnte allerdings kein eindeutiger Expressionsgradient entlang der Kolonkrypte festgestellt werden.

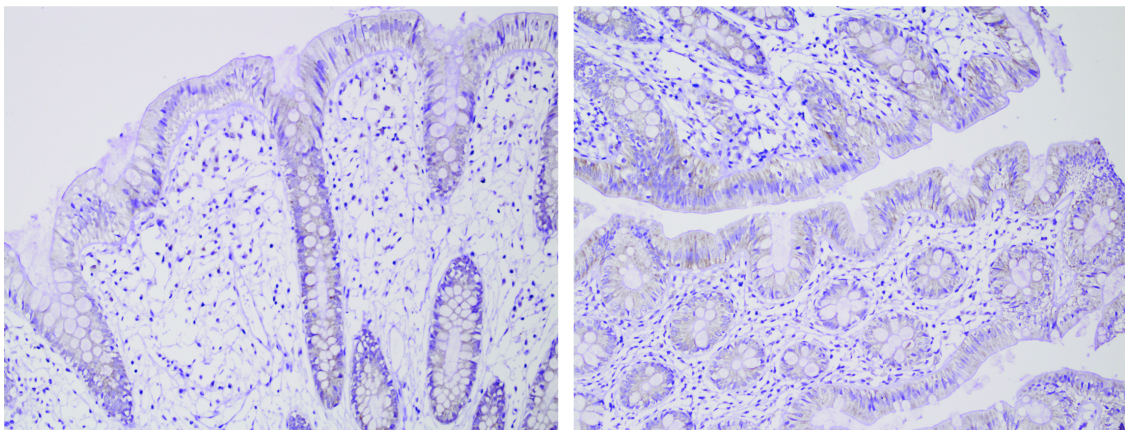


Abbildung 26: MK5 wird im Kolonepithelium exprimiert.

Kolonepithelgewebe wurde fixiert und immunhistochemisch mit einem MK5-spezifischen Antiserum gefärbt. Die Kolonkrypten wurden vorwiegend längs (links) bzw. quer (rechts) geschnitten. Die Schnitte und die Färbungen wurden von Sabine Roth im Labor von Prof. Andreas Rosenwald (Universität Würzburg) angefertigt.

4.5.2 MK5 induziert Differenzierungsmarker in Kolonkarzinomzellen

Da MK5 in Kolonepithelzellen exprimiert ist, wurde überprüft, ob die MK5-vermittelte Myc-Regulation auch in Kolonkarzinomzelllinien besteht. Wie bereits in HeLa-Zellen beschrieben (siehe Abb. 7B, 8B), führte die exogene Expression von wildtyp-MK5 und der konstitutiv-aktiven MK5L337G-Mutante auch in der Kolonkarzinom-Zelllinie Ls174T zu reduzierten Myc-Proteinmengen (Abb. 27A). Übereinstimmend mit den bisher beschriebenen Daten (siehe Abb. 8D, 8E) ist die *MYC*-mRNA-Menge dabei nicht verändert (Abb. 27B).

Die Überexpression von MK5 führte zur Induktion der Genexpression von *EFNB1* und *MUC2*, die für die beiden Differenzierungsmarker Ephrin B1 und Mucin 2 kodieren. Bei Ephrin B1 handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase, deren Aktivität für die Struktur und die Homöostase des Kolonepithels essentiell ist (Miao and Wang, 2009). Weiterhin induzierte MK5 die Expression von *CDKN1A*, was für den Zellzyklusinhibitor p21 kodiert (Abb. 27B). Auch *LGR5*, ein Marker für intestinale Stammzellen, wurde durch exogene MK5-Expression reprimiert (Abb. 27B).

Die MK5-Depletion führte in Ls174T-Zellen zur gesteigerten Myc-Proteinexpression (Abb. 27C). In diesen Zellen konnte eine milde Repression von *EFNB1* detektiert werden (Abb. 27D). Ls174T-Zellen exprimieren wildtyp-p53 (te Poele and Joel, 1999). Da in Kolonkarzinomen p53 häufig mutiert ist, wurde überprüft, ob der p53-Status von Kolonkarzinom-Zelllinien für die MK5-induzierte Regulation von *EFNB1* eine wichtige Rolle spielt. Dazu wurden HCT116-Zellen verwendet, die entweder p53-profizient oder p53-defizient sind. In beiden Zelllinien führte die Depletion von MK5 zu gesteigerten Myc-Proteinmengen. (siehe Abb. 13B). In p53-defizienten HCT116-Zellen führte die Depletion von MK5 zur reduzierten *EFNB1*-Expression (Abb. 27E). Somit konnte einerseits gezeigt werden, dass die MK5-induzierte Regulation der Myc-Proteinexpression auch in Kolonkarzinom-Zelllinien funktional ist. Andererseits führten erhöhte MK5-Proteinmengen zur gesteigerten *EFNB1*-Expression, die MK5-Depletion hingegen zur verminderten *EFNB1*-Expression.

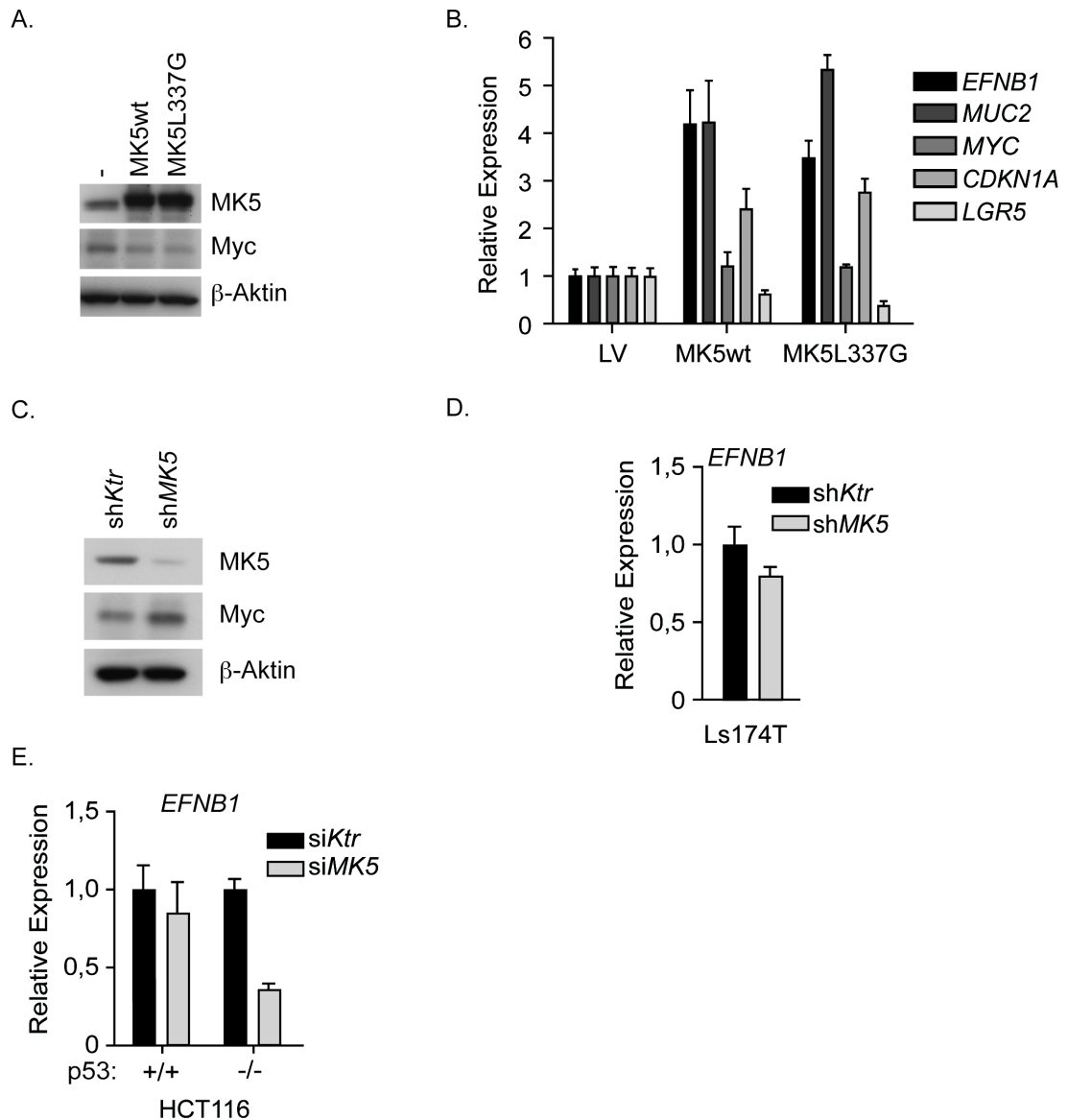


Abbildung 27: MK5 reguliert Differenzierungsmarker wie z.B. *EFNB1* in Kolonkarzinomzellen.

- (A) Exogene MK5-Expression vermindert die Myc-Proteinmenge. Ls174T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für wildtyp-MK5, konstitutiv-aktives MK5L337G bzw. mit dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert und nach 48 geerntet. Die Proteinexpression von MK5, Myc und β -Aktin wurde mittels Immunoblot detektiert.
- (B) MK5 induziert die Expression von Differenzierungsmarkern und reprimiert den Stammzellmarker *LGR5*. Aus den in (A) beschriebenen Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, cDNA hergestellt und die Expression der Differenzierungsmarker *EFNB1* und *MUC2*, des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A*, von *MYC* und vom Stammzellmarker *LGR5* durch qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + SD (n = 3).
- (C) MK5-Depletion erhöht die Myc-Proteinexpression. Ls174T-Zellen wurden retroviral mit dem shMK5-Plasmid bzw. mit der Kontroll-shRNA (shKtr) infiziert und selektioniert. Die Zelllysate wurden auf die Expression von MK5, Myc und β -Aktin untersucht.
- (D) MK5-Depletion vermindert die *EFNB1*-Expression. Die in (C) beschriebenen Zellen wurden durch qRT-PCR auf die Expression von *EFNB1* analysiert. Die Daten sind dargestellt als MW + SD (n = 3).
- (E) MK5-Depletion reduziert die *EFNB1*-Expression p53-abhängig. p53-profiziente (+/+) bzw. -defiziente (-/-) HCT116-Zellen wurden mit siMK5 bzw. einer Kontroll-siRNA (siKtr) transfiziert und nach 72 Stunden geerntet. Aus Gesamt-RNA wurde cDNA hergestellt und durch qRT-PCR die Expression von *EFNB1* bestimmt als MW + SD (n = 3).

4.5.3 Die MK5-Protein- und MK5-mRNA-Expression ist im Kolonkarzinom reduziert verglichen mit normalem Kolonepithelium

MK5 reguliert Markergene, die für die Homöostase und Differenzierung von Kolonepithelzellen verantwortlich sind (siehe Abb. 27). Wird die Integrität des Kolonepitheliums gestört, können sich kolorektale Adenome und Adenokarzinome entwickeln. Die Entstehung von Kolontumoren erfolgt in einem mehrstufigen Prozess. Zunächst entstehen benigne Adenome, die dann nach zusätzlichen Mutationen in maligne Adenokarzinome übergehen können (Arends, 2000). Da mit zunehmender Malignität der Kolontumoren auch der Differenzierungsgrad abnimmt, wurde überprüft, ob MK5 in der Kolonkarzinogenese eine Rolle spielt. Dazu wurden gut- bzw. schlecht-differenzierte Adenokarzinome in der Arbeitsgruppe von Prof. Rosenwald (Universität Würzburg) mit einem MK5-spezifischen Immuns serum immunhistochemisch gefärbt. MK5 war in gut-differenzierten Adenokarzinomen teilweise exprimiert (Daten nicht gezeigt). In manchen Arealen der Schnitte fand sich eine Färbung, während andere Bereiche MK5-negativ waren. In schlecht-differenzierten Adenokarzinomen war keine MK5-Proteinexpression detektierbar, während das gesunde Kolonepithelium MK5-positiv gefärbt wurde (Abb. 28A). Da MK5 die Expression des Differenzierungsmarkers *EFNB1* positiv regulierte, wurden die Adenokarzinom-Schnitte außerdem mit Ephrin B1-Antikörpern gefärbt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Ephrin B1-Expression mit der von MK5 korrelierte. Das gesunde Kolonepithel war Ephrin B1-positiv, während das Adenokarzinom-Gewebe Ephrin B1-negativ war (Abb. 28B). Da MK5 die Proteinexpression von Myc negativ reguliert, wurde weiterhin die Myc-Proteinexpression in Adenokarzinomen gefärbt. Es konnte eine inverse Korrelation mit der Expression von MK5 festgestellt werden (Abb. 28C). Während das normale Kolonepithel nur eine schwache Myc-Proteinexpression aufwies, zeigte das Adenokarzinom eine starke nukleäre Myc-Färbung.

Insgesamt wurden 25 Kolontumorschnitte mit MK5-Antikörpern gefärbt und die Korrelation des Differenzierungsgrades des Tumorgewebes mit der MK5-Färbeintensität untersucht (Abb. 28D). Der Differenzierungsgrad G1 bedeutet, dass das Gewebe gut differenziert ist, während der Differenzierungsgrad G2 für mäßig und Grad G3 für sehr schlecht differenziertes Tumorgewebe steht. Die Färbeintensität wurde mit 0 (keine Färbung), 1 (schwache Färbung) bzw. 2 (starke Färbung) angegeben. Zwischen den G1- und G2-Tumoren konnte kein signifikanter Unterschied in der MK5-Proteinmenge

detektiert werden, wobei G3-Tumoren sowohl gegenüber G1- als auch gegenüber G2-Tumoren signifikant häufiger MK5-negativ waren.

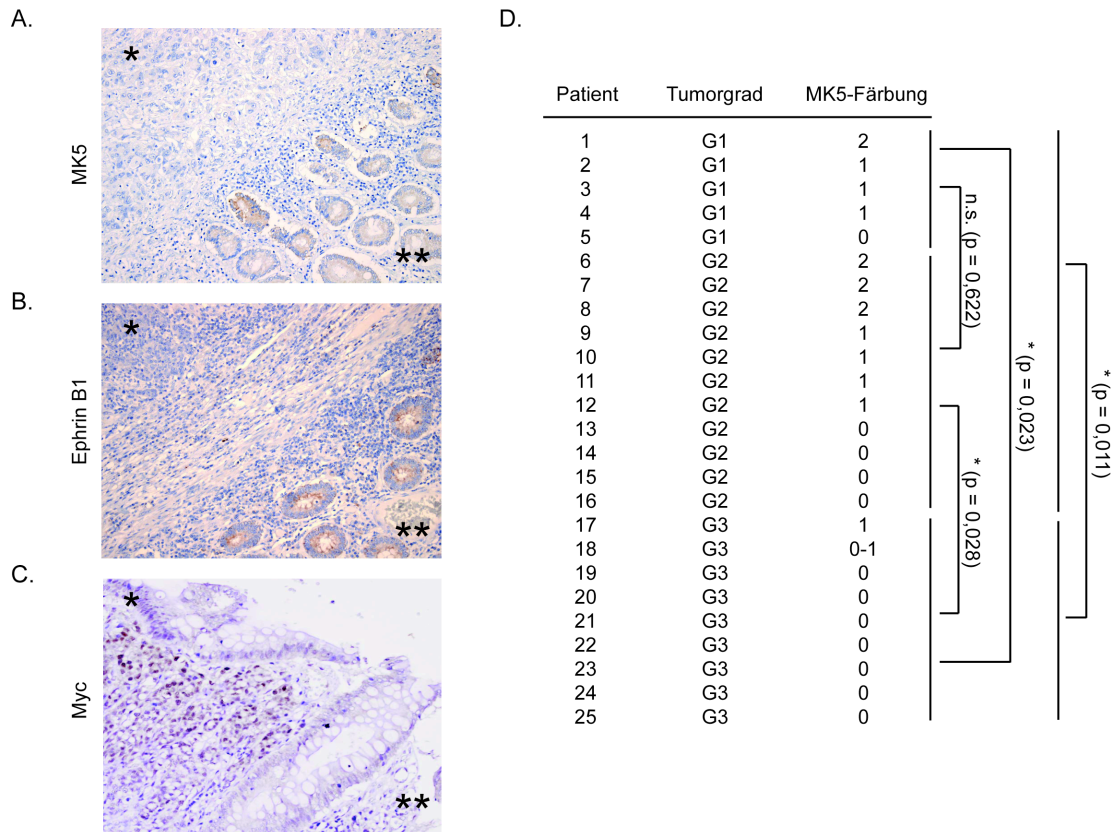


Abbildung 28: Schlecht-differenzierte kolorektale Adenokarzinome sind MK5- und Ephrin B1-negativ, aber Myc-positiv.

- (A) – (C) Kolorektale Adenokarzinome wurden fixiert und die Expression von MK5 (A), Ephrin B1 (B) und Myc (C) durch Immunhistochemie bestimmt. Die Schnitte und die Färbungen wurden von Sabine Roth im Labor von Prof. Andreas Rosenwald (Universität Würzburg) erstellt. Während das Tumorgewebe (*) MK5- und Ephrin B1-negativ war, wurde das Myc-Protein dort stark exprimiert. Im gesunden Kolonepithelgewebe (**) waren MK5 und Ephrin B1, aber nicht Myc exprimiert.
- (D) Mit abnehmendem Differenzierungsgrad sinkt die MK5-Proteinexpression. 25 Kolonkarzinome unterschiedlichen Differenzierungsgrades (G1 = gut differenziert; G2 = mäßig differenziert; G3 = schlecht differenziert) wurden wie in (A) beschrieben auf die MK5-Proteinexpression gefärbt. Die Färbeintensität wurde mit 0 (keine Färbung), 1 (schwache Färbung) oder 2 (starke Färbung) angegeben und die Korrelation zwischen den Differenzierungsgraden und der Färbeintensität bestimmt. Die p-Werte wurden mit Hilfe des ‚Exakten Fisher’s Tests‘ bestimmt.

Salazar et al. haben die Genexpression von nahezu 400 Patientenproben von kolorektalen Karzinomen bestimmt (Salazar et al., 2010). In dieser Studie wurden die Tumoren ebenfalls nach dem Differenzierungsgrad als G1-, G2- und G3-Tumoren unterschieden. Diese Expressiondaten wurden von Paul Roepman (Agendia BV, Amsterdam) auf die *MK5*-mRNA-Menge untersucht (Abb. 29A). Gut-differenzierte G1- und mäßig-differenzierte G2-Tumoren exprimieren *MK5*, während die *MK5*-Expression in den

schlecht-differenzierten G3-Tumoren signifikant reduziert ist. Hierdurch konnten die Daten der Immunhistochemie bestätigt werden. Die verminderte *MK5*-mRNA-Expression korrelierte zudem signifikant mit der Metastasierungshäufigkeit der Kolontumoren (Abb. 29B).

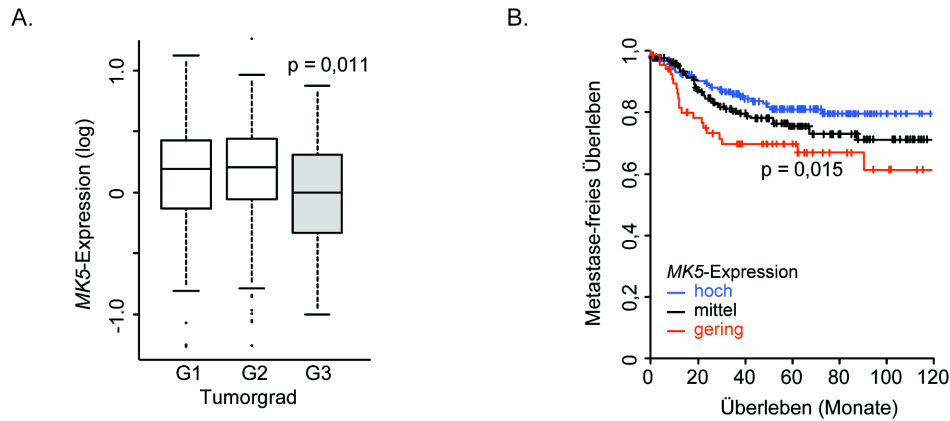


Abbildung 29: Die verminderte *MK5*-mRNA-Expression korreliert mit der Metastasierungshäufigkeit.

- (A) Die *MK5*-mRNA-Expression ist in schlecht-differenzierten G3-Kolontumoren signifikant vermindert. Die *MK5*-mRNA-Expression ist dargestellt als logarithmische *Boxplots* für gut-differenzierte G1- ($n = 103$), mäßig-differenzierte G2- ($n = 241$) und schlecht-differenzierte G3-Tumoren ($n = 46$).
- (B) Verminderte *MK5*-mRNA-Expression korreliert mit erhöhter Entstehung von Fernmetastasen. Dargestellt ist die Kaplan-Meier-Analyse der Metastasen-freien Überlebenszeit von 396 Kolonkarzinompatienten mit hoher (blaue Linie, $n = 160$), mittlerer (schwarze Linie, $n = 168$) oder geringer (rote Linie, $n = 68$) *MK5*-mRNA-Expression. Die Daten wurden analysiert von Paul Roepman (Agendia BV, Amsterdam).

4.5.4 Der *MK5*-Promotor ist in Kolonkarzinomzelllinien nicht hypermethyliert

Weiterhin wurde untersucht, wodurch die *MK5*-Expression im malignen Kolonkarzinom reprimiert wird. Der *MK5*-Promotor enthält eine CpG-Insel (siehe Abb. 25A). CpG-Inseln sind genomische, etwa 500 bis 2000 Basenpaare umfassende DNA-Abschnitte in eukaryotischen Promotoren, die einen erhöhten CpG-Dinukleotidgehalt aufweisen. Dieser beträgt im Gesamtgenom etwa 40% und ist in CpG-Inseln auf über 60% erhöht. Methylierung der CpG-Insel führt zu einer Repression der Transkription (Übersichtsartikel: (Esteller, 2007)).

Durch Behandlung von Zellen mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidin (AzadC) und dem Histondeacetylase-Hemmer Trichostatin A (TSA) kann die DNA-Methylierung *in vivo* inhibiert und somit durch Hypermethylierung stillgelegte Gene reaktiviert werden. Drei Kolonkarzinom-Zelllinien (Caco-2, HT-29 und Ls174T) wurden verwendet, um zu testen, ob der *MK5*-Promotor *in vivo* hypermethyliert war. In Ls174T-

Zellen ist der Differenzierungsmarker *MUC2* durch Hypermethylierung stillgelegt (Vincent et al., 2007). *MUC2* dient somit als Positivkontrolle, um den Effekt von AzadC und TSA zu testen. Wie erwartet wurde durch Behandlung der Ls174T-Zellen mit AzadC bzw. mit AzadC und TSA die Expression von *MUC2* induziert (Abb. 30A). Die Behandlung mit AzadC und/oder TSA führte aber in keiner der drei getesteten Zelllinien zu einer gesteigerten *MK5*-mRNA-Expression (Abb. 30B). Weiterhin wurde überprüft, ob das Gen eines *MK5*-stabilisierenden Proteins hypermethyliert war und somit durch DNA-Demethylierung ohne Effekte auf *MK5*-mRNA-Ebene eine *MK5*-Induktion auf Proteinebene vorlag. Nach AzadC- und TSA-Behandlung war die *MK5*-Proteinexpression jedoch stabil oder vermindert (Abb. 30C). Dies zeigt zusammenfassend, dass *MK5* in Kolonkarzinom-Zelllinien nicht durch Hypermethylierung der DNA reprimiert wird.

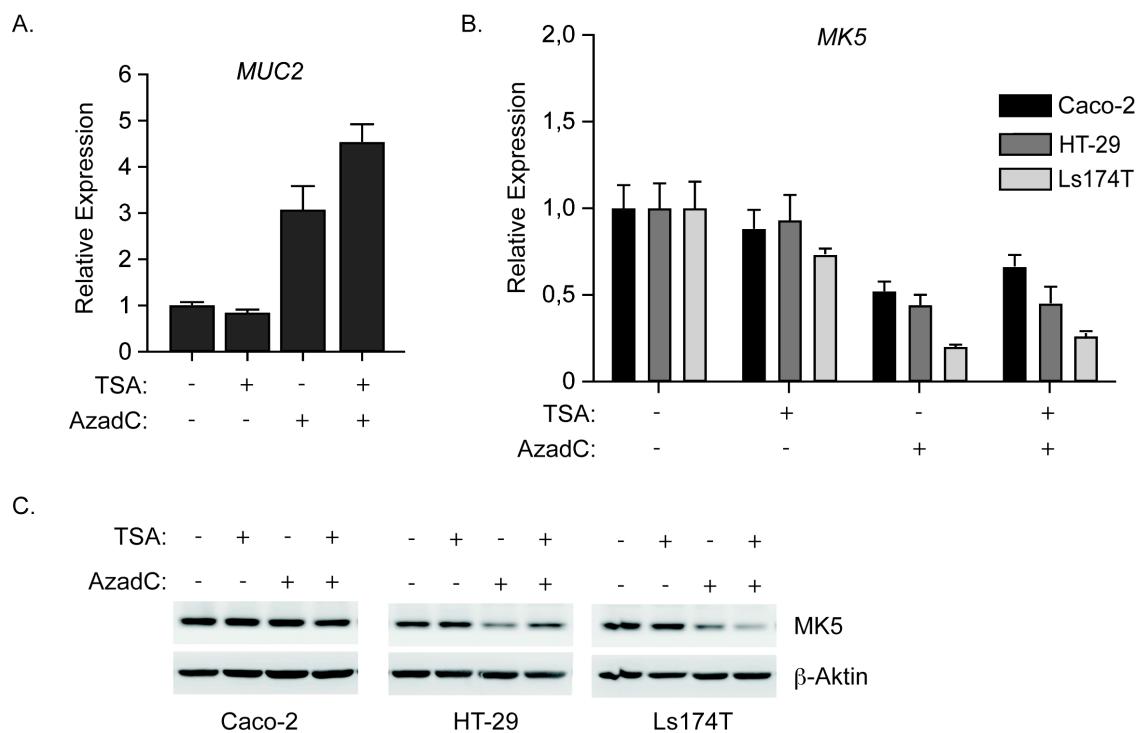


Abbildung 30: Der *MK5*-Promotor ist in Kolonkarzinomzellen nicht durch Hypermethylierung stillgelegt.

- (A) DNA-Demethylierung führt zur Induktion von *MUC2*. Ls174T-Zellen wurden mit 5-Aza-2'-deoxycytidin (AzadC; 10 μ M, 72 h) und/oder mit dem Histondeacetylase-Hemmer Trichostatin A (TSA; 300 nM; 24 h) inkubiert. Den Zellen wurde jeden Tag frisches Medium mit den Inhibitoren zugegeben. Die Zellen wurde nach drei Tagen geerntet und die Expression von *MUC2* durch qRT-PCR bestimmt.
- (B) DNA-Demethylierung induziert nicht die *MK5*-mRNA-Expression. Die Kolonkarzinom-Zelllinien wurden mit AzadC (Caco-2: 10 μ M; HT-29: 5 μ M; Ls174T: 10 μ M; 72 h) und/oder TSA (Caco-2: 80 nM; HT-29: 300 nM; Ls174T: 300 nM; 24 h) behandelt. Nach Abernten der Zellen wurde die Expression von *MK5* durch qRT-PCR bestimmt und die Daten als Mittelwert \pm SD (n = 3) dargestellt.
- (C) DNA-Demethylierung induziert nicht die *MK5*-Proteinexpression. Die in (B) beschriebenen Zellen wurden mittels Immunoblot auf die Proteinexpression von *MK5* untersucht.

5 Diskussion

5.1 Hochdurchsatzanalyse identifiziert MK5 als Myc-regulierende Kinase

Der Transkriptionsfaktor Myc reguliert mehrere zelluläre Prozesse wie Proliferation, Metabolismus, Zellwachstum und Apoptose. Die Myc-Proteinexpression muss daher sehr genau kontrolliert sein, um die Homöostase auf Zell-, Gewebe- und Organismusebene zu erhalten. Während Wachstumsfaktoren zur Stabilisierung von Myc führen, reprimiert Stress wie beispielsweise DNA-Schaden die Myc-Proteinexpression. Zur Identifikation bisher unbeschriebener Mechanismen der Regulation der Myc-Proteinexpression wurde ein Hochdurchsatzanalyse-Verfahren entwickelt und etabliert. Mit dessen Hilfe wurde eine Vielzahl von Kinasen auf ihre Rolle in der post-transkriptionellen Regulation der Myc-Proteinexpression untersucht.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene RNAi-Bibliotheken für die Hochdurchsatzanalyse eingesetzt. Dabei handelte es sich zum einen um die am NKI in Amsterdam erstellte shRNA-Bibliothek (Brummelkamp et al., 2002), die gegen die humanen Kinasen gerichtet war. Zum anderen wurde die siRNA-Bibliothek von Dharmacon/ThermoFisher Scientific gewählt, die ebenfalls das humane Kinom als Zielgene enthielt. Insgesamt betrachtet ergab die siRNA-Bibliothek bei der Auswertung qualitativ bessere Werte. Dies lag daran, dass die Depletionseffizienz verglichen mit der shRNA-Bibliothek deutlich besser war (Daten nicht gezeigt).

Bei der Selektion von positiven Treffern einer Hochdurchsatzanalyse gibt es zwei Möglichkeiten. Man kann sich einerseits ohne weitere bioinformatische Analyse oder Literaturrecherche die Treffer mit den stärksten Effekten für die Validierung auswählen. Dabei wird nicht auf bekannte Funktionen oder Regulationen der Treffer geachtet. Die zweite, hier gewählte Trefferselektion erfolgte durch Analyse der Trefferliste nach Anreicherung von Kinasen innerhalb bereits beschriebener Signalwege.

Ein in der Trefferliste angereichertes Netzwerk beinhaltete den MAPK-Signalweg (siehe Abschnitt 4.1.4). Für das Myc-Protein wurde bereits beschrieben, dass der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg die Proteinstabilität erhöht (Sears et al., 1999) (siehe auch Abschnitt 1.1.3.6). Komponenten dieses MAPK-Signalweges traten in unserem *Screen* nicht auf. Das kann daran liegen, dass es auf jeder Ebene des Signalweges mehrere, zumindest teilweise

redundante Kinasen gibt: A-Raf, B-Raf und C-Raf (Raf-1); MEK1 und MEK2; Erk1 und Erk2. Die Depletion von einer der redundanten Kinasen kann wahrscheinlich durch Aktivität der jeweiligen anderen Kinasen kompensiert werden und führt daher nicht zu einer veränderten Myc-Proteinexpression.

Die Validierung der ausgewählten Treffer innerhalb der MAPK-Signalwege ergab die stärksten und am besten reproduzierbaren Effekte bei der Depletion der Kinase *MK5/MAPKAPK5/PRAK*. Daher folgt zunächst eine Einführung in die Regulation und die zellulären Funktion von MK5.

5.2 Die Proteinkinase MK5

5.2.1 Familie und Struktur der Kinase MK5

Die Proteinkinase MK5 wurde 1998 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben (New et al., 1998; Ni et al., 1998). New et al. prägten aufgrund der Aktivierung und Regulierung durch die p38-Kinase für das humane Protein den Namen PRAK (*p38 regulated/activated kinase*), während Ni et al. der murinen Kinase aufgrund der Ähnlichkeit zu MAPKAPK2, 3 und 4 den Namen MAPKAPK5 gaben. In der Literatur hat sich der Name MK5 durchgesetzt und daher wurde die Serin/Threonin-spezifische Kinase auch in dieser Arbeit als MK5 bezeichnet. MK5 gehört zur Familie der MAP-Kinase aktivierten Proteinkinasen (MAPKAPKs, MKs). Diese Familie beinhaltet die ribosomalen S6-Kinasen (RSK1-4), die MAPK-interagierenden Kinasen (MNK1-2), die Mitogen- und Stress-aktivierten Kinasen (MSK1-2) und die MKs (MK2, 3, 5).

MK5 steht den beiden MAPKAPKs MK2 und MK3 sowohl evolutionär als auch funktional am nächsten. Die Aminosäuresequenz von MK5 ist zu 40 – 45% identisch mit MK2 bzw. MK3, während letztere zu 75% identisch sind (New et al., 1998; Ni et al., 1998; Underwood et al., 2003). Die katalytische Kinasedomäne von MK5 ist in allen Vertebraten konserviert, aber weder in der Fruchtfliege *D. melanogaster* noch im Nematodenwurm *C. elegans*. Dieser Nematodenwurm exprimiert nur eine der drei MKs, nämlich MK2. MK3 ist nicht stark konserviert und existiert nur in Säugetieren und Vögeln (Gaestel, 2006). Charakteristisch für die MKs ist neben der Kinasedomäne auch die C-terminale Region, die sowohl ein nukleäres Exportsignal (NES) als auch ein nukleäres

Lokalisationssignal (NLS) beinhaltet (Abb. 31). MK2 und MK3 besitzen eine N-terminale Prolin-reiche Region, die *in vitro* mit SH3 (*Src* homology domain 3)-Proteinen interagieren kann. Diese fehlt sowohl in MK5 als auch in MK2 von Insekten und Nematoden.

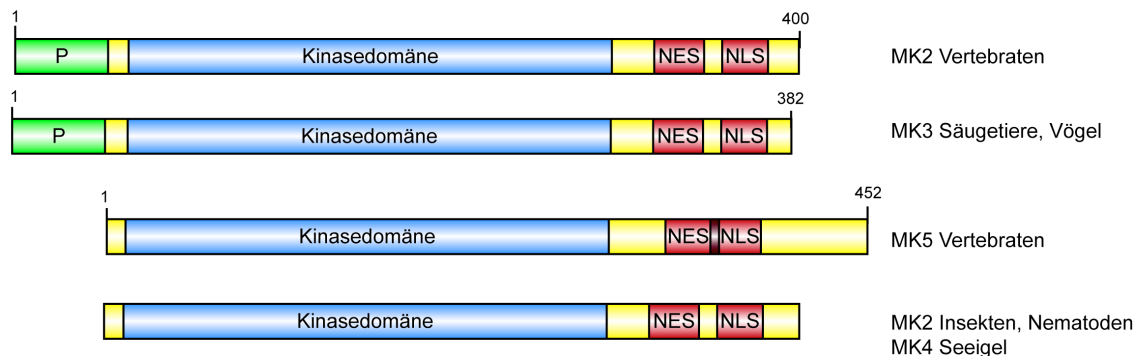


Abb. 31: Die Primärstruktur der MAPKAPKs MK2, MK3 und MK5 im Vergleich.

Dargestellt ist die Primärstruktur der MAPKAPKs MK2, MK3 und MK5. Neben der hochkonservierten Kinasedomäne beinhalten die Kinasen am C-Terminus ein nukleäres Exportsignal (NES) und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). MK2 und MK3 besitzen weiterhin eine Prolin-reiche Region (P), die *in vitro* mit SH3-Domänen interagiert (Angelehnt an: (Gaestel, 2006)).

5.2.2 Biologische Funktionen von MK5

MK5 wird in Vertebraten ubiquitär in allen untersuchten Geweben exprimiert (New et al., 1998; Ni et al., 1998). Während zahlreiche Substrate für MK2 beschrieben sind (siehe Übersichtsartikel (Gaestel, 2006)), die das Aktin-Zytoskelett, die Zellmigration, den Zellzyklus und die Chromatin-Umstrukturierung regulieren, sind die Zielproteine der MK5-Kinase weniger gut beschrieben. Auch ist noch kein eindeutiges Substraterkennungsmotiv bekannt. Während für MK2 das Phosphorylierungsmotiv (L/F/I)-(X)-(R)-(Q,S,T)-(L)-(pS/pT)-(hydrophobe Aminosäure) beschrieben wurde (Manke et al., 2005), geht man bei MK5 aufgrund einzelner gemeinsamer Substrate wie Hsp25 und Hsp27 von einem ähnlichen Substraterkennungsmotiv aus (New et al., 1998). Diese Annahme wurde experimentell nicht bestätigt.

Hsp27, Glykogensynthase und die leichte Kette von Myosin II waren die ersten beschriebenen MK5-Substrate *in vitro* (New et al., 1998; Ni et al., 1998). Zunächst war umstritten, ob Hsp27 auch *in vivo* ein MK5-Substrat ist. In MK5-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) konnte *in vivo* keine Phosphorylierung des Hsp27-homologs Hsp25 nachgewiesen werden (Shi et al., 2003). In der Rattenzelllinie PC12 phosphoryliert MK5 jedoch Hsp27 *in vivo* an den physiologisch-relevanten Serinen 78 und

82 und reguliert die Umgestaltung von fibrillärem Aktin (F-Aktin) (Kostenko et al., 2009). Exogen und endogen exprimiertes MK5 interagiert mit Hsp27 (Kostenko et al., 2009). Weiterhin hemmt die Interaktion von MK5 mit 14-3-3 ϵ die Hsp27-Phosphorylierung, die F-Aktin-Polymerisierung und somit die Zellmigration (Tak et al., 2007). Ein weiteres MK5-Substrat ist das Tumorsuppressorprotein p53 (Sun et al., 2007). Das aktive Ras-Protein aktiviert MK5 über den p38-Signalweg. MK5 phosphoryliert p53 direkt an Serin 37 und steigert so dessen transkriptionelle Aktivität, was zur Seneszenzinduktion führt (Sun et al., 2007).

Sowohl die Hemmung der Zellmigration durch Phosphorylierung von Hsp27 als auch die Seneszenzinduktion durch Phosphorylierung von p53 weisen darauf hin, dass MK5 die Tumorentstehung und das Tumorstadium negativ beeinflussen könnte. Somit würde man annehmen, dass MK5-defiziente Mäuse eine erhöhte Tumorzinzidenz aufweisen. Shi et al. generierten MK5-defiziente Mäuse durch homologe Rekombination (Shi et al., 2003). Auf einem gemischten genetischen Hintergrund aus der Kreuzung von zwei verschiedenen Mausstämmen (129 x C57/B6) konnte kein signifikanter Phänotyp der MK5-Defizienz beobachtet werden. Die Mäuse waren lebensfähig und fertil und zeigten sowohl bei der histologischen Gewebearanalyse als auch bei der Verhaltensanalyse keine Auffälligkeiten.

Auf einem reinen C57/B6-Hintergrund zeigt die MK5-Defizienz allerdings eine embryonale Lethalität mit unvollständiger Penetranz (Schumacher et al., 2004). Die Mäuse sterben zwischen dem embryonalen Tag E 11.5 und der Geburt aufgrund von Entwicklungsdefekten. Am embryonalen Tag E 12 wurden 50% weniger MK5^{-/-}-Embryonen gezählt als nach den Mendel'schen Regeln zu erwarten wären (Schumacher et al., 2004). Die lebensfähigen MK5^{-/-}-Mäuse waren bei der Geburt etwas leichter als ihre Geschwistertiere, zeigten aber keine morphologischen oder histologischen Auffälligkeiten (Schumacher et al., 2004). Die Gründe für die embryonale Lethalität mit unvollständiger Penetranz sind nicht bekannt. Bisher wurde nur ein plazentaler Phänotyp ausgeschlossen. In beiden MK5-defizienten Mauslinien wurde kein Einfluss der MK5-Deletion auf die spontane Tumorzinzidenz beobachtet.

Die Rolle von MK5 wurde *in vivo* auch in transgenen C57/B6-Mäusen untersucht, die eine konstitutiv-aktive Mutante von MK5 exprimieren (MK5L337A) (Gerits et al., 2007). Diese Mäuse sind normal entwickelt und zeigen weder in der Größe noch im Gewicht Auffälligkeiten gegenüber den Wurfgeschwistern. Die MK5-Expression ist besonders stark im Gehirn ausgeprägt, was als Ursache für die Verhaltensveränderungen der transgenen

MK5L337A-Mäuse gilt. Gerits et al. beobachteten, dass weibliche transgene Tiere weniger ängstlich waren als die Kontrolltiere. Bei männlichen Tieren fiel eine erhöhte Lokomotoraktivität auf (Gerits et al., 2007). Die Gründe für die geschlechtsspezifischen Unterschiede sind nicht bekannt. Da nach unseren Daten durch Expression einer konstitutiv-aktiven MK5-Mutante die Myc-Proteinexpression reduziert ist, würde man davon ausgehen, dass die MK5L337A-Mäuse einem Myc-Deletionsphänotyp ähneln. Während die Myc-Deletion zur embryonalen Lethalität führt, zeigen MK5L337A-Mäuse keinerlei Entwicklungsdefekte. Die Diskrepanz beider Phänotypen wurde experimentell nicht untersucht.

5.2.3 Regulation von MK5

MK5 wird, wie auch die anderen MAPKAPs, von MAP-Kinasen aktiviert. Dabei gibt es mehrere MAPK-Signalwege, die sich in der Aktivierung und der Substratspezifität unterscheiden, wobei die verschiedenen Signalwege zusätzlich quervernetzt sind (Abb. 32).

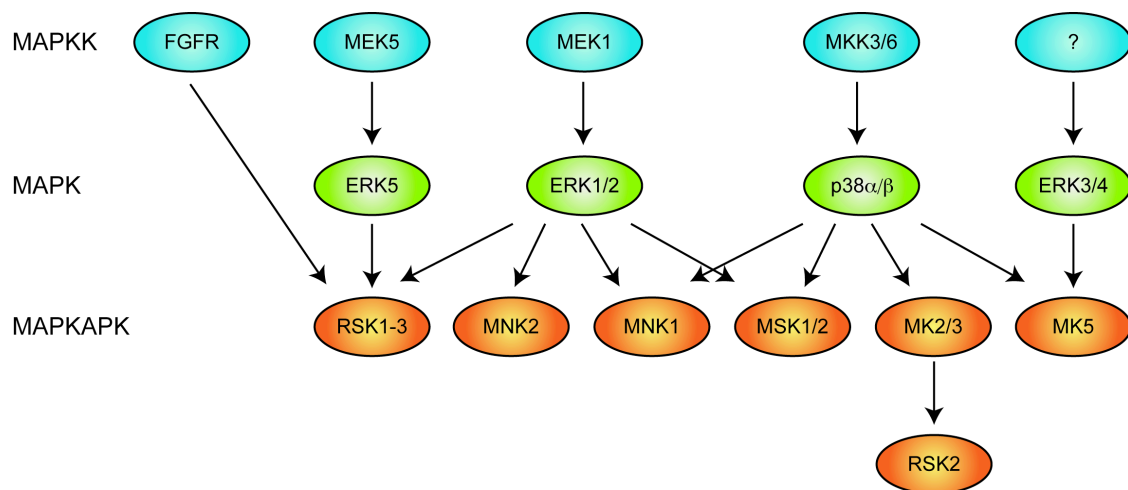


Abb. 32: Die Aktivierung der MAPKAP-Kinasen.

Es gibt mehrere MAP-Kinase (*mitogen activated protein kinases*)-Signalwege, die die MAPKAP-Kinasen (*MAPK-activated protein kinases*) aktivieren. Blau dargestellt sind die MAPK-Kinasen (MAPKK), die die MAP-Kinasen (MAPK, grün) durch Phosphorylierung aktivieren. Diese wiederum phosphorylieren und aktivieren die MAPKAP-Kinasen (MAPKAPK, orange). (Angelehnt an (Gaestel, 2008)).

In ruhenden Zellen befindet sich MK5 aufgrund des funktionalen nukleären Lokalisations-signals (NLS) prädominant im Nukleus, während eine Aktivierung von MK5 zur zytoplasmatischen Akkumulation führt. Für MK5 sind zwei prädominante Aktivierungs- und Regulations-wege beschrieben. Bei der Erstbeschreibung von MK5 wurden p38 (New et al., 1998) bzw. p38 und Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) (Ni et al., 1998) als

Aktivatoren identifiziert. p38 β induziert durch direkte Bindung und somit Blockierung des NLS die zytoplasmatische Akkumulation und die Aktivierung von MK5 (New et al., 2003; Seternes et al., 2002). Diese Regulation von MK5 durch p38 spielt auch in der Ras-induzierten Seneszenz eine entscheidende Rolle (Sun et al., 2007). Andererseits wurde in Hefe-2-Hybridsystemen (*yeast-2-hybrid*; Y2H) nicht p38, sondern die Kinase Erk3/MAPK6 als Interaktionspartner von MK5 identifiziert (Schumacher et al., 2004; Seternes et al., 2004). Die Expression von Erk3 führt dabei zur zytoplasmatischen Relokalisierung, zur Stabilisierung und zur Aktivierung von MK5. Zwei Jahre später wurde Erk4/MAPK4 als weiterer Aktivator von MK5 beschrieben (Aberg et al., 2006; Kant et al., 2006). Wie auch Erk3 bindet Erk4 MK5, führt zu dessen Translokation ins Zytoplasma und zur anschließenden Aktivierung. Während die Kinaseaktivität für die Aktivierung von MK5 durch Erk3 nicht notwendig ist, ist diese für Erk4 essentiell (Aberg et al., 2006; Kant et al., 2006). Von beiden Arbeitsgruppen wird beschrieben, dass eine Komplexbildung aus Erk3 bzw. Erk4 mit MK5 für die MK5-Kinaseaktivität essentiell ist. Ob der p38- und/oder der Erk3/4-Signalweg die entscheidende Rolle für die MK5-Aktivierung spielen, wird in der Literatur derzeit kontrovers diskutiert (siehe Übersichtsartikel (Shiryaev and Moens, 2010)).

Viele Versuche in den verschiedenen Publikationen über die MK5-Aktivierung durch die p38-Kinasen wurden mit exogener Überexpression durchgeführt. Endogen konnte weder eine Interaktion von MK5 mit der p38-Kinase noch die Phosphorylierung durch die p38-Kinase nachgewiesen werden. Daher geht man davon aus, dass die endogene Aktivierung p38-unabhängig erfolgen kann. Auch in Hefe-2-Hybridsystemen wurde nicht p38 als Bindepartner von MK5 identifiziert, sondern Erk3 (Schumacher et al., 2004; Seternes et al., 2004).

In den Trefferlisten meiner RNAi-Screens traten weder die p38 α - noch die p38 β -Kinase auf (siehe Tabellen 1, 2). Wir vermuteten zunächst, dass es an der funktionalen Redundanz der Kinasen lag und der Funktionsverlust einer der beiden Kinasen durch die jeweilige anderen kompensiert wurde. Daher wurde bei der weiteren Analyse der MK5-Aktivierung durch die p38-Kinasen in dieser Arbeit ein niedermolekularer Inhibitor verwendet, der beide Kinasen inhibiert (SB203580; Sigma). Doch auch dieser Inhibitor hatte keinen Einfluss auf die Myc-Proteinexpression (Daten nicht gezeigt). Auch die Aktivierung von p38 α/β durch die Überexpression von konstitutiv-aktivem MKK6 (*MAP kinase kinase 6*) (Raingeaud et al., 1996) zeigte keinen Einfluss auf die Myc-Proteinmengen (Daten nicht

gezeigt). Daher handelt es sich bei p38 in den hier untersuchten Zellsystemen weder um einen Regulator der Myc-Proteinexpression noch um einen essentiellen MK5-Aktivator.

Auch Erk3 und Erk4 waren in den Trefferlisten der RNAi-Screens nicht vorhanden (siehe Tabellen 1, 2). Dennoch wurde in Folgeexperimenten im Rahmen dieser Arbeit auch für diese beiden Kinasen der Effekt der Gendepletion auf die Myc-Proteinexpression untersucht. Bei Einzeldepletion von Erk3 oder Erk4 erhöhten sich unter manchen Bedingungen die Myc-Proteinexpression, die durch Doppeldepletion noch gesteigert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es sich bei diesen beiden Kinasen um funktional redundante Enzyme für die Regulation der Myc-Proteinexpression handelt und der Effekt vor allem durch Doppeldepletion erzielt wird. Da die Effekte nicht in allen getesteten Zelllinien eindeutig reproduzierbar waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von Erk3 und Erk4 auf die Regulation der Myc-Proteinmengen nicht genauer untersucht.

5.3 MK5 reguliert die Myc-Expression und das Zellwachstum p53-unabhängig

5.3.1 MK5 beeinflusst die Myc-Proteinexpression Zelltyp-unabhängig

In dieser Arbeit wurde eine neue biologische Funktion von MK5 beschrieben, da eine *MK5*-Depletion die Myc-Proteinexpression erhöht. In der Hochdurchsatzanalyse wurde ein Zellklon der U2OS-Zelllinie verwendet. Um auszuschließen, dass die *MK5*-Depletion die Myc-Proteinexpression nur in diesem einen Zellklon erhöhte, wurden weitere Zelllinien unterschiedlicher Gewebeherkunft getestet. Es wurden Tumorzelllinien aus dem Osteosarkom, dem Ovarialkarzinom und dem Kolonkarzinom verwendet. Die *MK5*-Depletion erhöhte die Myc-Proteinexpression dabei Zelllinien- und Zelltyp-unabhängig (Abb. 7A). Der Effekt wurde in primären, nicht-transformierten humanen Fibroblasten nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt) und scheint daher spezifisch für transformierte Tumorzellen zu sein (siehe auch Abschnitt 5.10).

Unspezifische Nebeneffekte der siRNA-Transfektion wurden durch Verwendung von mehreren einzelnen siRNAs statt des Gemisches von vier Sequenzen (Abb. 8A) bzw. von Vektor-basierten shRNAs (Abb. 8C) ausgeschlossen. In allen Fällen führte eine Depletion von *MK5* zu erhöhten Myc-Proteinmengen (Abb. 7, 8). Die Überexpression von

konstitutiv-aktivem MK5 führte dagegen zur Myc-Repression (Abb. 7B). Auch die Expression einer siRNA-resistenten MK5-Mutante führte bei Kotransfektion mit siMK5 zur Abnahme der Myc-Proteinexpression (Abb. 8B). Somit handelte es sich bei der in der Hochdurchsatzanalyse beobachteten Myc-Regulation durch MK5-Depletion nicht um einen sequenzunspezifischen Nebeneffekt der siRNA-Transfektion.

5.3.2 MK5 hemmt das Zellwachstum

Die Quantifizierung der Myc-Proteinexpression nach MK5-Depletion ergab in den meisten Experimenten etwa 2 bis 3-fache Induktionen (z.B. Abb. 7A). In transgenen Myc-Mausmodellen ist dieser Anstieg ausreichend, um signifikante physiologische Effekte zu erzielen. So führt eine etwa 2-fache Überexpression eines induzierbaren Myc-Allels zur onkogenen Proliferation einer Vielzahl von Geweben (Murphy et al., 2008).

Eine Reduktion der intrazellulären Myc-Proteinexpression hingegen induziert einen Wachstumsarrest und bei etablierten Tumoren *in vivo* die Tumorregression in multiplen Gewebetypen: in der Haut (Flores et al., 2004; Pelengaris et al., 1999), in der Leber (Beer et al., 2004; Shachaf et al., 2004), im Brustgewebe (D'Cruz et al., 2001), im Pankreas (Pelengaris et al., 2002) und im hämatopoetischen System (Felsher and Bishop, 1999; Marinkovic et al., 2004). Die Überexpression von konstitutiv-aktivem MK5 und somit reduzierte Myc-Proteinmengen reduzierten auch das Wachstum von Osteosarkomzellen (Abb. 7C) und reprimierten deren Koloniebildung (Abb. 7D). Diese Effekte waren nicht durch vermehrte Apoptose entstanden (Daten nicht gezeigt). Da die Zellmorphologie nicht verändert war, lässt sich auch Seneszenz als Ursache für die verlangsamte Proliferation ausschließen, obwohl für MK5 eine wichtige Rolle in der Seneszenzinduktion postuliert wird (Sun et al., 2007).

Obwohl MAP-Kinasen meist die Proliferation stimulieren, ist das reduzierte Wachstum von MK5-überexprimierenden Zellen (Abb. 7C) nicht die einzige Ausnahme. Es gibt mehrere Berichte, dass eine MAP-Kinase-Aktivierung die Proliferation von Zellen inhibieren kann. Die MAP-Kinase p38 inhibiert die Proliferation sowohl von normalen als auch von Tumorzellen unter anderem durch Antagonisierung des JNK/c-Jun Signalweges (Engel et al., 2005; Hui et al., 2007a; Hui et al., 2007b; Perdiguero et al., 2007).

5.3.3 MK5 beeinflusst die Myc-Proteinmenge p53-unabhängig über miR-34b/c und das 3'-UTR der *MYC*-mRNA

Eine transkriptionelle Regulation der Myc-Proteinexpression durch MK5 wurde durch Analyse der *MYC*-mRNA-Expression nicht beobachtet (Abb. 8D, E). Weiterhin wurde eine Stabilisierung der *MYC*-mRNA durch *MK5*-Depletion ausgeschlossen. Auch veränderte MK5 die Extrahierbarkeit des Myc-Proteins nicht (Abb. 10).

Die Myc-Proteinexpression wird sehr stark über Veränderungen der Halbwertszeit reguliert. So führt beispielsweise die Phosphorylierung von Myc an S62 und T58 durch die Kinasen Erk und GSK3 β zur Ubiquitinierung und zum Myc-Abbau (siehe Abschnitt 1.1.3.6). Auch die Ubiquitin-spezifische Protease Usp28 verändert durch Deubiquitinierung von Myc dessen Halbwertszeit (Popov et al., 2007). Durch Verwendung des Translationsinhibitors Cycloheximid wurde aber ausgeschlossen, dass *MK5*-Depletion zur Verlängerung der Myc-Proteinhalbwertszeit führt (Abb. 9). Vielmehr erhöht MK5 die Translationsrate von *MYC*, was durch eine *in vivo*-metabolische Markierung mit radioaktivem Methionin gezeigt wurde (Abb. 11A). Durch den Einsatz von verschiedenen *MYC*-Expressionkonstrukten wurde nachgewiesen, dass das 3'-UTR für die MK5-Regulation der *MYC*-Translation essentiell ist (Abb. 11B, C).

Es gibt mehrere miRNAs, die die *MYC*-Translation über das 3'-UTR reprimieren, wie z.B. miR-34 (He et al., 2007; Kong et al., 2008), miR-145 (Sachdeva et al., 2009) oder let-7 (Akao et al., 2006; Sampson et al., 2007). In mehreren Versuchen mit Transfektionen von synthetischer miRNA bzw. von miRNA-Antagonisten wurde die miR-34-vermittelte Regulation der Myc-Proteinexpression auch in den hier verwendeten Zellen nachgewiesen (Abb. 12A und Daten nicht gezeigt). MK5 reguliert spezifisch miR-34b und miR-34c, die von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden (He et al., 2007). miR-34a blieb sowohl nach *MK5*-Depletion als auch nach *MK5*-Überexpression unverändert (Abb. 12 und Daten nicht gezeigt). Durch miRNA-antagonisierende Oligonukleotide konnte gezeigt werden, dass miR-34b/c die wichtigsten durch MK5 regulierten, *MYC*-gerichteten miRNAs sind (Abb. 12D). Diese Daten wurden im Rahmen einer Kollaboration von Ian Cannell (University of Leicester, Arbeitsgruppe Martin Bushell) bestätigt. Er verwendete Expressionsplasmide, bei denen das Luziferase-Gen an das 3'-UTR der *MYC*-mRNA gekoppelt war. Das 3'-UTR der *MYC*-mRNA wurde einerseits als Wildtyp, andererseits als miR-34-Bindestellen-Mutante verwendet (Kong et al., 2008). Im Kontrollzustand war die Luziferase-Proteinexpression des wildtyp-Konstruktes verglichen mit der Mutante deutlich

reduziert, was auf die Repression durch die miR-34-Familienmitglieder zurückzuführen ist. In *MK5*-depletierten Zellen war das wildtyp-Konstrukt nur wenig schwächer exprimiert als die Mutante. Dies lässt darauf schließen, dass in *MK5*-depletierten Zellen durch Verminderung der miR-34b/c-Expression das wildtyp-Konstrukt nicht mehr reprimiert werden kann (Daten nicht gezeigt).

Als Transkriptionsaktivatoren für die miR-34 Familie der miRNAs wurden p53 (Bommer et al., 2007; Chang et al., 2007b; He et al., 2007) und ELK1 (Christoffersen et al., 2010) beschrieben. Während p53 alle drei Familienmitglieder reguliert, aktiviert ELK1 spezifisch miR-34a. Da noch kein Transkriptionsfaktor für die spezifische miR-34b/c-Regulation identifiziert war und p53 ein direktes *MK5*-Zielprotein ist, wurde in dieser Arbeit zunächst p53 als potentieller Mediator zwischen *MK5* und miR-34b/c untersucht. Die Regulation der Myc-Proteinexpression durch *MK5* erfolgte jedoch p53-unabhängig (Abb. 13). Auch die miR-34c-Expression nach Induktion von DNA-Schäden erfolgt p53-unabhängig (Cannell et al., 2010). Cannell et al. beschreiben jedoch keinen alternativen Transkriptionsfaktor für die miR-34c-Expression.

Zur Identifikation von Transkriptionsfaktoren, die die *MK5*-abhängige Regulation der Myc-Proteinexpression vermitteln, wurde eine Analyse des BC021736-Promotors durchgeführt. Dabei wurden stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle mehrere Konsensus-Bindestellen für die Familie der FoxO-Transkriptionsfaktoren identifiziert (Abb. 14A). Daher werden im Folgenden die Funktionen und die Regulation der FoxO-Proteine näher beschrieben.

5.4 FoxO-Transkriptionsfaktoren

5.4.1 Die Familie der FoxO-Transkriptionsfaktoren

Die Transkriptionsfaktoren der *Forkhead*-Box (Fox)-Familie zeichnen sich durch eine hochkonservierte, etwa 100 Aminosäuren-umfassende DNA-Bindedomäne aus. Beim Menschen gehören zur Fox-Familie ca. 45 Mitglieder, die in 19 Fox-Untergruppen (FoxA bis FoxS) eingeteilt werden (Hannenhalli and Kaestner, 2009). Die FoxO-Familie besteht in Säugetieren aus vier Proteinen: FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHRL1), FoxO4 (AFX1) und FoxO6. Die FoxO-Proteine besitzen zwei für die Funktionen essentielle Domänen: die

N-terminale *Forkhead*-DNA-Bindedomäne (DBD) und die C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) (Abb. 33).

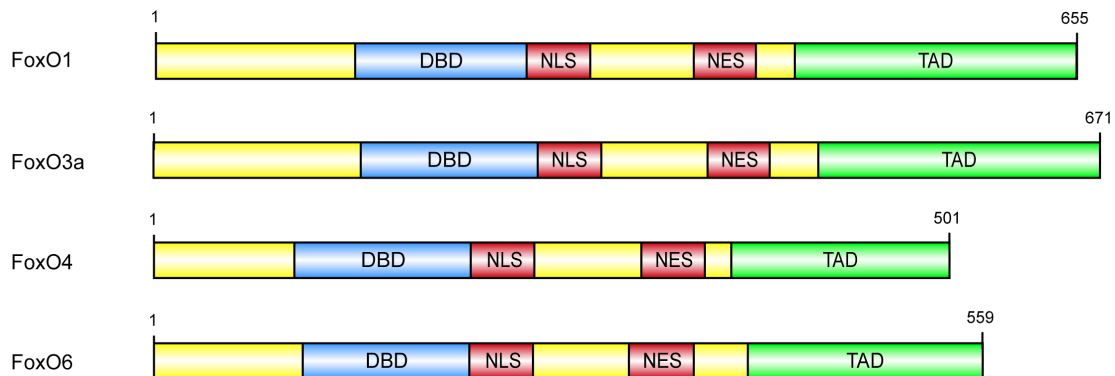


Abb. 33: Vergleich der Primärstrukturen der vier humanen FoxO-Proteine.

Dargestellt ist die Primärstruktur der FoxO-Proteine FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHRL1), FoxO4 (AFX) und FoxO6. Neben der hochkonservierten *Forkhead*-DNA-Bindedomäne (DBD) beinhalten die Transkriptionsfaktoren am C-Terminus eine Transaktivierungsdomäne (TAD). Weiterhin besitzen sie sowohl ein nukleäres Exportsignal (NES) als auch ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). (Angelehnt an (Greer and Brunet, 2008; van der Horst and Burgering, 2007)).

5.4.2 Molekulare und biologische Funktionen von FoxO-Proteinen

Die FoxO-Proteine FoxO1, FoxO3a und FoxO4 sind nahezu ubiquitär exprimiert, ähnlich reguliert und teilen sich transkriptionelle Zielgene (Burgering, 2008). FoxO6 ist fast ausschließlich im Gehirn exprimiert und unterscheidet sich in Regulation und Funktion teilweise von den drei anderen FoxO-Proteinen (Jacobs et al., 2003).

Für die transkriptionellen Funktionen der FoxO-Proteine ist neben der C-terminalen Transaktivierungsdomäne vor allem die DNA-Bindedomäne (DBD) essentiell. Sie besteht aus drei α -Helices, drei β -Faltblättern und zwei Flügelregionen, die das dritte β -Faltblatt flankieren. FoxO-Proteine binden die DNA als Monomere über die dritte α -Helix und die daran angrenzenden Bereiche sowie über die Flügelregionen (Clark et al., 1993). Die DBD erkennt und bindet die Konsensus-FoxO-Bindestellen, die G/ATAAAT/CA (Brunet et al., 1999), bzw. RYAAAYAW, lauten und auch FRE (*FoxO-responsive element*) bzw. IRS (*insulin-responsive sequence*) genannt werden. FoxO-Proteine können die Transkription der Zielgene aktivieren und reprimieren, wobei die Zielgene je nach Regulationsmechanismus in drei Klassen eingeteilt werden (Ramaswamy et al., 2002). Die Klasse I beinhaltet die FoxO-Zielgene, die über direkte FoxO-DNA-Bindung induziert werden. FoxO bindet dabei an ein IRS- bzw. FRE-Element und induziert so die Transkription (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2000; Weigelt et al., 2001). Bei der

Klasse II handelt es sich um aktivierte Zielgene, bei denen FoxO entweder indirekt über andere Transkriptionsfaktoren oder direkt über IRS-unabhängige Konsensussequenzen an die DNA bindet (Ramaswamy et al., 2002). In der Klasse III befinden sich die FoxO-reprimierten Zielgene, wobei die Genrepression unabhängig von direkter FoxO-DNA-Bindung erfolgt (Bouchard et al., 2004; Ramaswamy et al., 2002).

Die FoxO-Transkriptionsfaktoren wirken tumorsuppressiv. Da viele Funktionen der FoxO-Proteine redundant sind, wurde eine Dreifach-*Knockout*-Maus generiert, bei der FoxO1, FoxO3a und FoxO4 durch die Expression der Cre-Rekombinase deletiert werden (Paik et al., 2007). Die Dreifach-Deletion führte in diesem Mausmodell zur Entstehung von Thymus-Lymphomen und von Hämangiomen. Zudem bewirkt FoxO über Induktion von p27 und Repression von D-Typ-Zyklinen (*CCND1* und *CCND2*) einen G1-Arrest (Medema et al., 2000; Nakamura et al., 2000). Durch Aktivierung von pro-apoptotischen Zielgenen wie *FASLG* (Fas-Ligand), *TNFSF10* (TRAIL; *TNF-related apoptosis inducing ligand*) oder *BCL2L1* (BIM; bcl-2 interacting protein) wird Apoptose induziert (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2000; Modur et al., 2002). Daneben werden Zellmetabolismus, Schutz vor oxidativem Stress, DNA-Reparatur und Zellalterung durch FoxO reguliert.

5.4.3 Regulation von FoxO-Proteinen durch Phosphorylierung

FoxO-Proteine werden fast ausschließlich durch post-translationale Proteinmodifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Glykosylierung reguliert (van der Horst and Burgering, 2007; Vogt et al., 2005). Der am besten charakterisierte Mechanismus ist die Phosphorylierung durch die Proteinkinase Akt/PKB (Biggs et al., 1999; Brunet et al., 1999). Akt phosphoryliert die FoxO-Proteine FoxO1, FoxO3a und FoxO4 an konservierten Serin- und Threoninresten, die sich bei FoxO3a an den Positionen T32, S253 und S315 befinden. Akt inaktiviert FoxO3a durch Phosphorylierung an diesen Resten, da phosphoryliertes Threonin 32 und Serin 253 die Bindung an das Adapterprotein 14-3-3 induzieren (Brunet et al., 1999). 14-3-3-Bindung induziert den nukleären Export und die Sequestrierung von FoxO3a im Zytoplasma. Das zytoplasmatische FoxO-Protein kann ubiquitiniert und schließlich abgebaut werden (Plas and Thompson, 2003).

Neben Akt sind weitere Kinasen beschrieben, die die FoxO3a-Aktivität inhibieren (Abb. 34). Die Kinase SGK (*serum/glucocorticoid-regulated kinase*) phosphoryliert FoxO3a an den Akt-Zielaminosäuren und führt ebenfalls zur Inaktivierung (Brunet et al., 2001). Die

I κ B-Kinase IKK β (*I κ B kinase beta*) phosphoryliert FoxO3a an Serin 644 innerhalb der Transaktivierungsdomäne und führt zur Translokation ins Zytoplasma, zur Polyubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau (Hu et al., 2004). Auch die Erk-Kinase phosphoryliert FoxO3a (Serin 294, Serin 344 und Serin 425) und führt zur Ubiquitinierung durch MDM2/HDM2 (*murine/human double minute 2*) und zum Abbau durch das Proteasom (Yang et al., 2008). Die Phosphorylierung von FoxO3a kann auch zur transkriptionellen Aktivierung führen. So phosphoryliert Mst1 FoxO3a vorwiegend an Serin 209 und erhöht die nukleäre Lokalisierung durch Unterbindung der FoxO3a:14-3-3-Interaktion (Lehtinen et al., 2006).

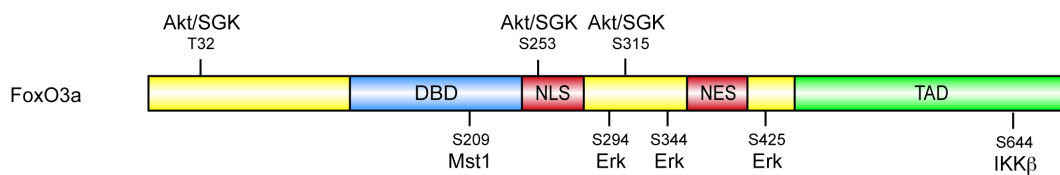


Abb. 34: FoxO3a Aktivität wird durch Phosphorylierung reguliert.

Dargestellt ist die Primärstruktur von FoxO3a. FoxO3a ist Zielprotein von mehreren Kinasen. Akt, SGK, IKK β und Erk inaktivieren FoxO3a, während Mst1 zur FoxO3a-Aktivierung führt. SGK: *serum/glucocorticoid-regulated kinase*; Erk: *extracellular signal-regulated kinase*; IKK β : *I κ B kinase beta*. DBD: DNA-Bindedomäne; TAD: Transaktivierungsdomäne. (Angelehnt an (van der Horst and Burgering, 2007)).

5.5 MK5 induziert den Wachstumsarrest über FoxO3a, miR-34b/c und Myc

5.5.1 MK5 phosphoryliert FoxO3a *in vitro* und *in vivo* und führt zu dessen nukleärer Anreicherung

Für die Familie der FoxO-Transkriptionsfaktoren wurden bereits sowohl aktivierende als auch inaktivierende Kinasen beschrieben (siehe Abschnitt 5.4.3). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MK5 FoxO3a an mehreren Serin-Resten phosphoryliert (Abb. 16): S215, S253 und S551/S555. In *in vitro*-Kinaseassays konnte gezeigt werden, dass die Mutation dieser vier Serine zu Alanine die Phosphorylierung durch die MK5-Kinase fast vollständig abrogiert (Abb. 18A). Die Phosphorylierung von S215 konnte auch *in vivo* mit Hilfe eines phospho-Epitop-spezifischen Antikörpers bestätigt werden (Abb. 18B).

Die durch oxidativen Stress induzierte Kinase Mst1 phosphoryliert FoxO3a an Serin 209 und induziert so dessen nukleäre Lokalisation (Lehtinen et al., 2006). Serin 209 und Serin

215 sind innerhalb derselben α -Helix von FoxO3a lokalisiert. Auch die Phosphorylierung von FoxO3a an S215 durch MK5 führte zu einer nukleären Akkumulation (Abb. 19A). Die Phosphorylierung von S215 ist zudem wichtig für die nukleäre Lokalisation von FoxO3a nach Inhibition der Akt-Kinase (Abb. 19B). Diese Beobachtung lässt sich mit folgender Hypothese erklären: die Phosphorylierung von S215 ist notwendig, um die Bindung von 14-3-3 und FoxO3a zu lösen. Die Überexpression von MK5 ist hierfür ausreichend und führt somit zur abgeschwächten 14-3-3:FoxO3a-Bindung und zur nukleären FoxO3a-Lokalisation. Die Inhibierung der Akt-Kinase führt bei wildtyp-FoxO3a zur nukleären Relokalisierung, die durch zusätzliche Phosphorylierung von S215 durch MK5 verstärkt und beschleunigt wird. FoxO3aS215A ist trotz Akt-Inhibierung stark zytoplasmatisch lokalisiert. Diese Hypothese wurde experimentell, wie z.B. durch Ko-Immunpräzipitationen, noch nicht bestätigt.

5.5.2 MK5-Phosphorylierungs-defizientes FoxO3aER(6A) ist beeinträchtigt in der MYC-Regulation und der Wachstumshemmung

Die Promotor-Analyse des Primärtranskripts für miR-34b und miR-34c ergab mehrere putative FoxO-Konsensus-Bindestellen (Abb. 14A). Die beiden Bindestellen an den Positionen -185 und -1223 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle konnten durch Chromatin-Immunpräzipitationen bestätigt werden (Abb. 14B, 18C). FoxO3a reguliert spezifisch die miR-34b/c-, nicht aber die miR-34a-Expression über direkte DNA-Bindung. Die Aktivierung von FoxO3a führt zudem zur Verminderung der Myc-Expression (Abb. 18B, 22A), wobei hierfür die das 3'-UTR der MYC-mRNA essentiell ist (Abb. 22B).

Für einen Großteil der Experimente wurde das FoxO3aER(3A)-Konstrukt verwendet, bei dem die drei Aminosäuren Threonin 32, Serin 253 und Serin 315 zu Alanin mutiert waren (siehe Abschnitt 4.2.3). Hierdurch konnte die FoxO3a-Funktion unabhängig von der Aktivität des Akt-Signalweges untersucht werden. FoxO3aER(3A) wird durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (OHT) aktiviert. Da das FoxO3aER(3A)-Protein ein artifizielles Fusionsprotein darstellt, musste überprüft werden, ob dieselben Funktionen auch durch wildtyp-FoxO3a reguliert werden. Wie FoxO3aER(3A) bindet auch wildtyp-FoxO3a an die beiden FoxO3a-Konsensus-Bindestellen im miR-34b/c-Promotor (Abb. 18C). Zudem wird durch wildtyp-FoxO3a nach Aktivierung durch MK5L337G (Abb. 18B) ebenso wie

durch aktives FoxO3aER(3A) die Myc-Proteinexpression reduziert (Abb. 22). Wie auch wildtyp-FoxO3a (Abb. 19A), relokalisiert FoxO3aER(3A) nach Aktivierung in den Zellkern (Abb. 20B). Dies bestätigte, dass sich das FoxO3aER(3A)-Fusionsprotein für die Analyse der zellulären FoxO3a-Funktionen sehr gut eignet und wurde daher auch für die weiteren Experimente eingesetzt. Zudem wurde durch die Mutationen der MK5-Zielserine eine MK5-Phosphorylierungs-defiziente FoxO3aER(6A)-Mutante hergestellt (Abb. 20A).

FoxO3aER(6A) zeigt nach Aktivierung eine verminderte nukleäre Akkumulation, wie es schon für FoxO3aS215A beschrieben wurde (Abb. 20B, 19A). Während die nukleäre Lokalisation der FoxO3aS215A-Mutante trotz der Aktivierung durch MK5L337G nur in etwa 15% der Zellen detektiert wurde, war FoxO3aER(6A) in allen Zellen teilweise nukleär akkumuliert. Dies kann daran liegen, dass die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) selbst die nukleäre Relokalisation fördert. Dennoch konnte ein deutlicher Unterschied zwischen dem FoxO3aER(3A)- und dem FoxO3aER(6A)-Fusionsprotein nachgewiesen werden, was bestätigt, dass die Phosphorylierung durch MK5 einen Einfluss auf die FoxO3a-Lokalisation ausübt. Die FoxO3aER(6A)-Mutante bindet nicht an die FoxO-Bindestellen im miR-34b/c-Promotor (Abb. 20C). Zudem induziert sie nach Aktivierung durch OHT weder die Expression von miR-34b noch von miR-34c (Abb. 21) und reduziert die Myc-Proteinexpression deutlich langsamer und schwächer als die FoxO3aER(3A)-Mutante (Abb. 22A).

MK5 reguliert die FoxO3a-Aktivität durch zwei Mechanismen: MK5 erhöht die nukleäre Akkumulation von FoxO3a und induziert die FoxO-DNA-Bindung an den miR-34b/c-Promotor. Die Phosphorylierung von FoxO3a an S215 konnte *in vivo* bestätigt werden und ist für die FoxO3a-Lokalisation und die Repression von Myc von essentieller Bedeutung (Abb. 18B, 19A). Eine strukturelle Analyse der DNA-Bindedomäne von FoxO3a ergab jedoch, dass die Phosphorylierung von S215 die DNA-Bindung verhindert (Caroline Kisker, Rudolf-Virchow-Zentrum Würzburg, persönliche Mitteilung). Die DNA-Bindedomäne besteht aus 3 α -Helices, 3 β -Faltblättern und zwei „Flügel“-Regionen. Die FoxO3a-DNA-Bindung wird von der dritten α -Helix und den beiden flankierenden Regionen vermittelt (Clark et al., 1993). S215 befindet sich innerhalb dieser dritten α -Helix der DNA-Bindedomäne und trägt über Wasserstoffbrückenbindungen direkt zur FoxO3a-DNA-Bindung bei (Abb. 35).

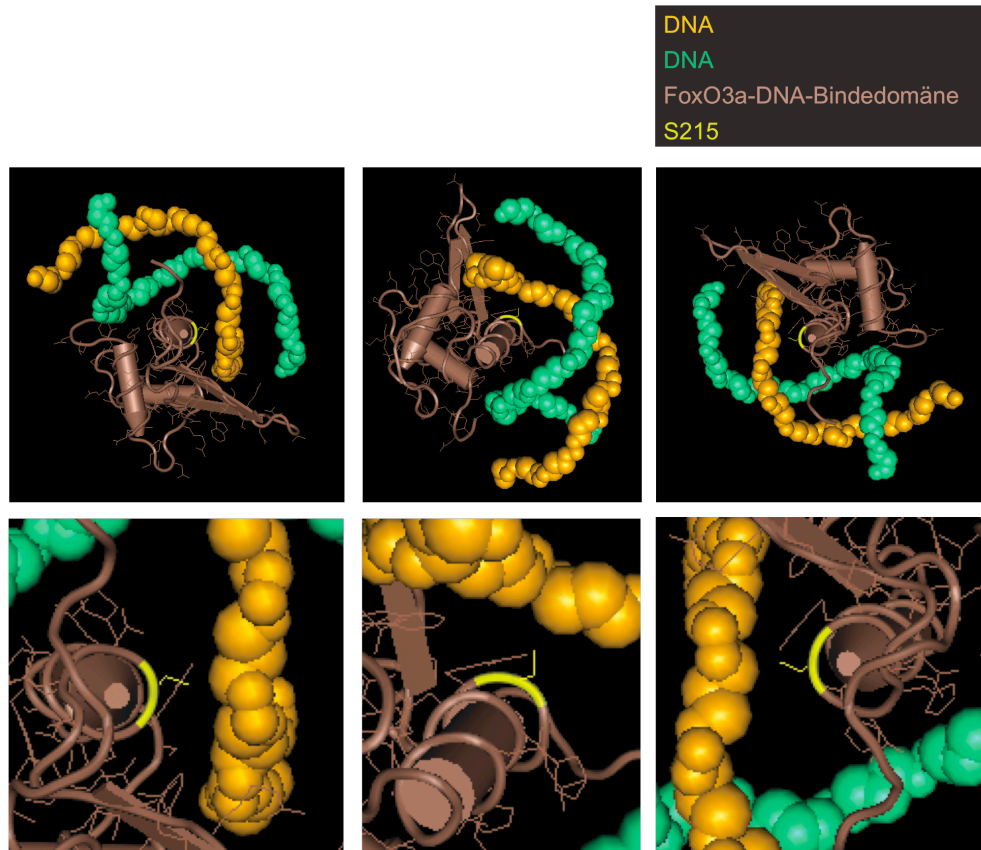


Abb. 35: S215 von FoxO3a trägt direkt zur DNA-Bindung bei.

Die DNA-Bindedomäne von FoxO3a (braun) bindet direkt an die DNA (grün, orange). Wichtig ist dabei unter anderem die Aminosäure S215 (gelb), die über Wasserstoffbrückenbindungen direkt zur DNA-Bindung beiträgt. In der oberen Reihe ist die gesamte DNA-Bindedomäne dargestellt. Die untere Reihe zeigt jeweils den Ausschnitt, der die Aminosäure S215 enthält. Die Strukturinformation wurde aus der NCBI-Datenbank extrahiert und mit Hilfe des Programmes Cn3D dargestellt.

Die durch die Phosphorylierung der Aminosäure S215 entstehende negative Ladung verhindert jedoch die DNA-Bindung. Daher muss man davon ausgehen, dass phosphoryliertes S215 vor der DNA-Bindung dephosphoryliert wird. Die Dephosphorylierung muss dabei im Zellkern durch eine nukleäre Phosphatase stattfinden, da pS215 essentiell für die nukleäre Relokalisation ist (Abb. 18B).

Wie MK5 ändert auch die Kinase Mst1 die subzelluläre Lokalisation von FoxO3a durch direkte Phosphorylierung einer Aminosäure innerhalb der dritten α -Helix der DNA-Bindedomäne: S209 (nach der Zählweise von Lehtinen et al.: S207) (Lehtinen et al., 2006). Hierfür wurde bereits nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von FoxO die DNA-Bindung nahezu vollständig inhibiert. Daher wird auch bei der Mst1-vermittelten Phosphorylierung vermutet, dass eine nukleäre Phosphatase FoxO dephosphoryliert (Brent

et al., 2008). In dieser Studie wurde zudem aufgrund der starken Homologie zwischen den verschiedenen humanen FoxO-Familienmitgliedern auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus von FoxO1 und FoxO3a geschlossen.

Die drei humanen FoxO-Proteine FoxO1, FoxO3a und FoxO4 sind sehr ähnlich aufgebaut und funktional größtenteils redundant (siehe Abschnitte 5.4.1 bis 5.4.3). Die Spezifität wird sowohl durch unterschiedliche Expressionsmuster als auch durch Isoform-spezifische Modifikationen erreicht (van der Horst and Burgering, 2007). Im Rahmen meiner Arbeit wurde die Rolle FoxO3a in der MK5-vermittelten Regulation der Myc-Proteinexpression analysiert. MK5 phosphoryliert FoxO3a an den Aminosäuren S215, S253 und S551/S555. Da die beiden Serine an den Positionen 215 und 253 auch bei FoxO1 und FoxO4 konserviert sind, ist eine MK5-Phosphorylierung dieser beiden FoxO-Proteine sehr wahrscheinlich. Dass die Region um die Aminosäuren S551 und S555 innerhalb der Transaktivierungsdomäne von FoxO3a nicht konserviert ist, weist darauf hin, dass FoxO3a zudem spezifisch reguliert wird.

Die Aktivierung von FoxO-Proteinen arretiert Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Hierfür wurden mehrere direkte FoxO-Zielgene beschrieben, z.B. *CDKN1B* (p27) (Medema et al., 2000), *RBL2* (p130) (Kops et al., 2002) oder auch *CCND1* (Cyclin D1) (Schmidt et al., 2002). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte das Primärtranskript von miR-34b und miR-34c als weiteres direktes Zielgen von FoxO3a identifiziert werden, das über die Repression der *MYC*-Translation eine entscheidende Rolle beim FoxO-induzierten Wachstumsarrest spielt. MK5 beeinflusst somit die Zellproliferation über den in dieser Arbeit erstmals beschriebenen FoxO-miR-34-Myc-Signalweg.

Parallel zu unserer Arbeit wurde auch von Gan et al. nachgewiesen, dass Myc ein wichtiger Mediator des FoxO-induzierten Wachstumsarrestes ist (Gan et al., 2010). Die Arbeitsgruppe beschreibt in einem Mausmodell für die Nierentumorentstehung, bei der das Gen für das Tsc1 (*tuberous sclerosis 1*)-Protein deletiert wurde, die Rolle von FoxO als Myc-Repressor. Die Untersuchung des Transkriptoms in FoxO-aktivierten Zellen identifizierte eine große Überlappung mit Myc-Zielgenen. Hierbei waren die reprimierten Gene nach FoxO-Aktivierung sehr stark angereichert für aktivierte Myc-Zielgene. Gan et al. beschreibt weiterhin in ihrer Arbeit zwei Mechanismen, über die FoxO zur Repression der Myc-Proteinexpression und zur Hemmung der Myc-Aktivität führt. Die FoxO-Aktivierung induziert die Expression der microRNA miR-145, die bereits als Repressor der *MYC*-Translation beschrieben war. Zudem erhöht FoxO die Expression des Proteins

Mxi1-SR α (*Max interacting protein 1 – strong repressor alpha*), das wiederum die transkriptionelle Aktivität von Myc reprimiert (Gan et al., 2010).

Die FoxO-vermittelte Repression der Myc-Proteinexpression spielt im Tsc1^{-/-}-Mausmodell eine essentielle Rolle bei der Tumورprogression. Während FoxO in benignen Tumoren exprimiert wird und aktiv ist, ist die FoxO-Proteinexpression in malignen Nierenzell-Karzinomen vermindert (Gan et al., 2010). Hierdurch ergeben sich Parallelen zu meiner eigenen Arbeit, bei der der Verlust der FoxO3a-vermittelten Myc-Repression ebenfalls entscheidend zur Tumورprogression beiträgt. Die Beteiligung von unterschiedlichen miRNAs (miR-34b/c vs. miR-145) deutet aber auf gewebespezifische Unterschiede hin. Während die miR-34b/c-Bindestelle innerhalb des 3'-UTRs der humanen und der murinen *MYC*-mRNAs hochkonserviert ist, ist dies für die miR-145-Bindestelle nicht der Fall (Martin Bushell, persönliche Mitteilung). Dass Gan et al. auch eine Regulation der *MYC*-mRNA-Expression beobachten, ist ein weiterer Unterschied der beiden Arbeiten. Dennoch belegen beide Arbeiten die essentielle Rolle der FoxO-vermittelten Myc-Repression bei der Tumورprogression.

5.6 MK5 ist ein direktes Myc-Zielgen

Ursprünglich wurde MK5 als Zielprotein der p38 α - und p38 β -Proteinkinasen identifiziert (New et al., 1998). Diese Beobachtung wurde als Mechanismus der MK5-Aktivierung im Rahmen der Ras-induzierten Seneszenz bestätigt (Sun et al., 2007). Als weitere MK5-Aktivatoren wurden die Kinasen Erk3 und Erk4 identifiziert (Aberg et al., 2006; Kant et al., 2006; Schumacher et al., 2004; Seternes et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte eine neue Regulationsmöglichkeit für die MK5-Proteinkinase erstmals beschrieben werden: *MK5* ist ein direktes Zielgen von Myc. Exogene Überexpression von Myc erhöht die MK5-Proteinmengen (Abb. 11C). Depletion von endogenem *MYC* hingegen reduziert die MK5-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 24 B, C). Zudem bindet Myc endogen direkt an die E-Box-Region innerhalb des *MK5*-Promotors (Abb. 25). Auch im Modell der Myc-Induktion nach Serumentzug und -stimulation konnte bestätigt werden, dass *MK5* ein Myc-Zielgen ist (Abb. 24D, E). Bei Myc handelt es sich jedoch um einen Transkriptionsfaktor, d.h. er

erhöht zwar die *MK5*-mRNA- und Proteinmenge, kann jedoch die MK5-Kinaseaktivität nicht direkt steigern. Meist werden Kinasen nach der Phosphorylierung durch andere Kinasen aktiviert. Für MK5 wurde jedoch auch ein anderer Mechanismus beschrieben. Die atypischen Kinasen Erk3 und Erk4 können MK5 durch Translokation und Stabilisierung aktivieren, wobei sie selbst über Expressionsmengen reguliert werden. Ich konnte in einigen Experimenten eine MK5-Aktivierung durch Erk3/4 bestätigen (Daten nicht gezeigt). Da die Ergebnisse nicht unter allen Bedingungen reproduzierbar waren, bleibt offen, wie genau MK5 nach Induktion durch Myc aktiviert wird.

5.7 Myc, MK5, FoxO3a und miR-34b/c bilden einen negativen Rückkopplungsmechanismus

Bei *MK5* handelt es sich um ein direktes induziertes Myc-Zielgen. Die MK5-Proteinkinase reprimiert wiederum über die FoxO3a-Phosphorylierung und die miR-34b/c-Induktion die Translation der *MYC*-mRNA und somit die Myc-Proteinexpression. Dadurch ergibt sich ein negativer Rückkopplungsmechanismus bestehend aus Myc, MK5, FoxO3a und miR-34b/c (Abb. 36).

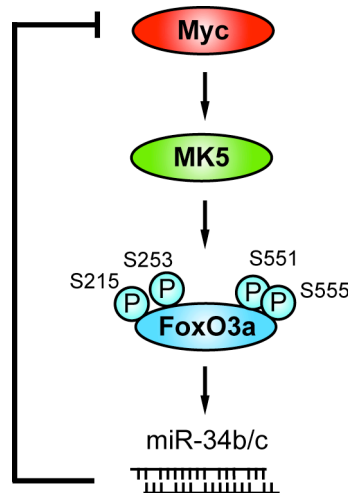


Abb. 36: Myc, MK5, FoxO3a und miR-34b/c bilden einen negativen Rückkopplungsmechanismus.

Der Transkriptionsfaktor Myc bindet an den Promotor des *MK5*-Gens und induziert dessen Expression. MK5 aktiviert FoxO3a durch Phosphorylierung von mehreren Serin-Resten. FoxO3a bindet an den miR-34b/c-Promotor und steigert deren Expression. miR-34b/c reprimieren die *MYC*-Translation über eine direkte Bindestelle im 3'-UTR der *MYC*-mRNA.

Bei Rückkopplungsmechanismen unterscheidet man positive, bei denen der zelluläre Phänotyp (wie z.B. die Myc-Proteinexpression) stetig gesteigert wird, von negativen, die es einem Protein ermöglichen, seine eigenen Mengen/Aktivitäten zu kontrollieren.

Für Myc wurden mehrere negative Rückkopplungsmechanismen beschrieben. So kontrolliert Myc beispielsweise seine Expression durch Reprimierung der Transkriptionsinitiation am eigenen Promotor (Penn et al., 1990). Myc induziert zudem einige microRNAs aus der miR-17-92-Gruppe. Diese miRNAs reprimieren die Translation der Transkriptionsfaktoren E2F1-3, was schließlich zur verminderten Myc-Proteinexpression führt (Aguda et al., 2008; Coller et al., 2007).

Ein für N-Myc beschriebener positiver Rückkopplungsmechanismus involviert die Proteinkinase Aurora-A (Otto et al., 2009). Bei dem für Aurora-A kodierenden Gen *AURKA* handelt es sich um ein direktes N-Myc-Zielgen. Die Aurora-A-Kinase wiederum stabilisiert das N-Myc-Protein, indem sie sowohl mit N-Myc als auch mit FBXW7 interagiert und das N-Myc-Protein vor dem proteasomalen Abbau schützt (Otto et al., 2009). Durch *AURKA*-Depletion konnten Otto et al. zeigen, dass dieser positive Rückkopplungsmechanismus für N-Myc-amplifizierte Neuroblastomzellen essentiell für das Tumorstadium ist. In N-Myc-nicht-amplifizierten Zellen hingegen hat eine Depletion von *AURKA* keinen Einfluss auf das Zellwachstum.

Diese Beispiele bestätigen die bedeutende Rolle von Rückkopplungsmechanismen für die Tumorentstehung. Durch Unterbrechung von negativen bzw. durch Verstärkung von positiven Rückkopplungsmechanismen können sowohl die Tumorentstehung als auch das Tumorstadium gefördert werden.

5.8 Die MK5-Expression im Kolonkarzinom sinkt mit zunehmender Malignität

Durch Immunhistochemie konnte die Proteinexpression der MK5-Proteinkinase in humanen Kolonepithelzellen nachgewiesen werden (Abb. 26). Das Kolon ist von einer Schleimhaut, der sogenannten Mukosa ausgekleidet, die die Krypten mit den verschiedenen Kolonepithel-Zelltypen formt: resorbierende Enterozyten, schleimbildende Becherzellen (*Goblet*-Zellen) und vereinzelt enteroendokrine Zellen. An der Kryptenbasis befinden sich außerdem die intestinalen Stammzellen. Die aus den Stammzellen

hervorgehenden transient-amplifizierenden Vorläuferzellen wandern in Richtung der Kryptenspitze, differenzieren zu den spezifischen Zelltypen und werden innerhalb weniger Tage ins Darmlumen abgeschilfert.

Die MK5-Proteinexpression wurde in den Epithelzellen, aber nicht im darunterliegenden Bindegewebe nachgewiesen (Abb. 26). Es konnte kein eindeutiger Expressionsgradient entlang der Krypten detektiert werden. Sowohl die Vorläufer- als auch die differenzierten Kolonepithelzellen färbten sich MK5-positiv. Nur die Stammzellen an der Kryptenbasis waren fast ausnahmslos MK5-negativ.

Durch eine Reihe von Mutationen entsteht aus gesundem Kolonepithel über die Zwischenstufe des Adenoms ein kolorektales Karzinom (Abb. 37) (Fearon and Vogelstein, 1990). Durch Mutationen des *APC*-Gens (*adenomatous polyposis coli*) wird der Wnt-Signalweg im Kolonepithel aktiviert und induziert die Entstehung von Adenomen. Das Wachstum der Adenome wird durch Mutation von K-Ras oder durch Verlust der *DCC*-Expression (*deleted in colon carcinoma*) beschleunigt. Am Übergang vom benignen Adenom zum malignen Adenokarzinom ist unter anderem der Verlust der *TP53*-Expression beteiligt, was für 60% der Adenokarzinome nachgewiesen wurde. Neben den hier beschriebenen Mutationen sind eine Reihe weiterer Gene und Signalwege, wie z.B. der TGF β -Signalweg, an der Entstehung von kolorektalen Karzinomen beteiligt (Übersichtsartikel: (de la Chapelle, 2004)).

Mit Hilfe der Immunohistochemie konnte gezeigt werden, dass die MK5-Proteinexpression mit abnehmendem Differenzierungsgrad des Adenokarzinoms sinkt. Die Malignität von kolorektalen Tumoren wird unter anderem durch den Differenzierungsgrad angegeben. In gut-differenzierten G1-Tumoren und mäßig-differenzierten G2-Tumoren ist MK5 exprimiert, während in schlecht-differenzierten G3-Tumoren nur noch in seltenen Fällen eine MK5-Proteinexpression nachweisbar ist (Abb. 28). Diese MK5-Proteinexpressionsdaten wurden auf mRNA-Ebene bestätigt (Abb. 29A). Dass der MK5-Verlust nicht nur eine Begleiterscheinung der Tumorprogression, sondern kausal daran beteiligt ist, zeigen Experimente in Kolonkarzinomzelllinien. Die MK5-Überexpression induziert die Expression von Markergenen der intestinalen Differenzierung, wie z.B. von *MUC2*, einem Marker für die intestinalen, schleimbildenden Becherzellen (Abb. 27B). Die MK5-Proteinexpression steigert auch die *EFNB1*-mRNA-Expression. *EFNB1* kodiert für Ephrin B1, einem membrangebundenen Liganden für die EphB-Rezeptortyrosinkinasen. Ephrin-Eph-Signalwege kontrollieren die Lage der verschiedenen Zelltypen innerhalb der

Kolonkrypte und somit auch die Kryptenstruktur (Cortina et al., 2007). Ephrin B1 ist daher für die Integrität der Kolonkrypten essentiell. MK5-Überexpression induziert die *EFNB1*-Expression, während MK5-Depletion in p53-negativen Zellen die *EFNB1*-Expression reduziert. Diese MK5-Ephrin B1-Korrelation wurde auch auf Proteinebene durch Immunhistochemie bestätigt (Abb. 28 und Daten nicht gezeigt). Dass die Ephrin B1-Expression die Progression zum Adenokarzinom supprimiert und in malignen Kolonkarzinomen reduziert ist, wurde bereits beschrieben (Batlle et al., 2005; Cortina et al., 2007). Durch Verlust der MK5-Proteinexpression und somit durch verminderte *EFNB1*-Expression ist die Differenzierung und Gewebestruktur der Kolonkrypten erheblich gestört. Wie genau *EFNB1* durch MK5 reguliert wird, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

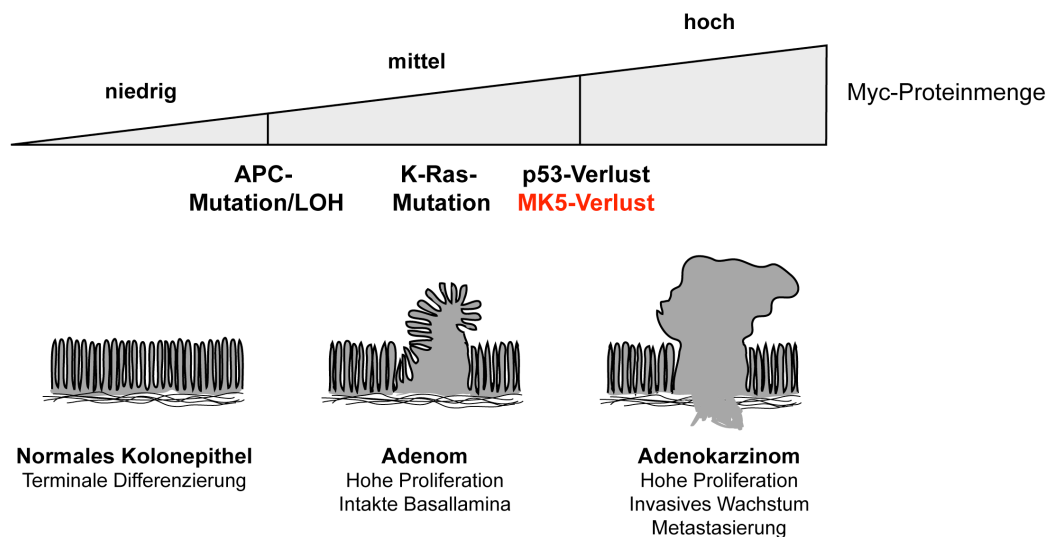


Abb. 37. MK5-Verlust führt zur Tumorprogression und zur Metastasierung von kolorektalen Adenokarzinomen.

Das kolorektale Adenokarzinom entwickelt sich nach der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein et al., 1989). Durch Mutationen oder durch LOH (*loss of heterozygosity*) des APC-Gens entstehen frühe benigne Adenome. K-Ras-Mutationen beschleunigen das Wachstum und begünstigen die Ausbildung von sogenannten späten Adenomen. Durch p53- und/oder MK5-Verlust erhöht sich die Myc-Proteinexpression und induziert den Übergang zum malignen Adenokarzinom, das durch invasives Wachstum zur Metastasierung führt.

Bei der Kolonkarzinogenese findet sowohl bei der Adenomentstehung als auch bei der Adenom- zu Adenokarzinom-Transition eine Erhöhung der Myc-Proteinexpression statt (Abb. 37). In relativ frühen Stadien der Tumorgenese wird die MYC-mRNA- und die Myc-Proteinexpression durch Aktivierung des Wnt-Signalweges, z.B. nach APC-Mutation oder -LOH (*loss of heterozygosity*), induziert. Zusätzlich findet beim Übergang vom Adenom zum Adenokarzinom eine Erhöhung der Myc-Proteinexpression statt, deren Ursache noch

nicht vollständig geklärt ist (Owen Sansom, Glasgow; persönliche Mitteilung). Die Beobachtung, dass die MK5-Proteinexpression bei diesem späten Schritt der Tumorgenese verloren geht, spricht dafür, dass der MK5-Verlust hierbei durch die Erhöhung der Myc-Proteinexpression eine bedeutende Rolle spielt.

Die Ursache des MK5-Verlustes im malignen, schlecht-differenzierten Kolonkarzinom ist nicht bekannt. In den getesteten Kolonkarzinomzellen konnte keine Hypermethylierung des *MK5*-Promotors festgestellt werden (Abb. 30). Jedoch muss diese Beobachtung in primären Tumorproben noch überprüft werden.

Der MK5-Expressionsverlust ist nicht nur an der Tumorprogression beteiligt, sondern auch an der Entstehung von Metastasen. Tumoren, die wenig *MK5*-mRNA exprimieren, bilden schneller Metastasen als *MK5*-positive Tumoren (Abb. 29B). Der der Metastasierung zugrundeliegende Mechanismus wurde experimentell nicht untersucht. Es gibt jedoch Berichte, die auf eine Rolle des Tumorsuppressors p14Arf (*alternate reading frame*) hinweisen könnten. Hohe Myc-Proteinmengen induzieren die Expression von p14Arf (Murphy et al., 2008). p14Arf kann sowohl an Myc als auch an das Partnerprotein Miz1 binden, wobei p14Arf die Bildung des Myc:Miz1-Komplexes induziert (Herkert et al., 2010). In p53-profizienten Zellen reprimiert der p14Arf-induzierte Myc:Miz1-Komplex die Zelladhäsion (Herkert et al., 2010). Auch in p53-defizienten Zellen fördert der Myc:Miz1-Komplex invasives Wachstum und somit die Entstehung von Metastasen (Chan et al., 2010).

5.9 Die Rolle des Myc-MK5-FoxO3a-miR-34b/c-Rückkopplungsmechanismus im kolorektalen Karzinom

Diese Arbeit belegt, dass der negative Rückkopplungs-mechanismus bestehend aus Myc, MK5, FoxO3a und miR-34b/c für die Tumorsuppression im Kolonkarzinom eine entscheidende Rolle spielt. Weiterhin wird die Autoregulation von Myc durch Verlust der *MK5*-mRNA- und MK5-Proteinexpression unterbrochen. Für die Kolonkarzinogenese wurden bereits zusätzliche Mutationen beschrieben, die ebenfalls zur Störung des Rückkopplungsmechanismus führen und somit auf dessen entscheidende Rolle bei der Kolonkarzinogenese hinweisen.

Die miR-34b/c-Expression ist beim kolorektalen Karzinom häufig vermindert, da die CpG-Insel innerhalb des miR-34b/c-Promotors hypermethyliert vorliegen kann (Toyota et al., 2008). Zudem ist in Tumoren die Akt-Kinase durch den Verlust der Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) oder durch aktivierende Mutationen der PI3-Kinase häufig konstitutiv aktiv (Wee et al., 2008). Durch einen aktiven Akt-Signalweg werden wie auch durch MK5-Verlust FoxO-Transkriptionsfaktoren inaktiviert.

Die Reaktivierung der MK5-Expression könnte für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen sinnvoll sein. Hierfür muss zunächst der Mechanismus des MK5-Verlustes analysiert werden. Vielversprechend sind auch die Beobachtungen, dass Kolonkarzinomzellen nach Reaktivierung von FoxO quieszent werden und nicht weiter proliferieren (Kops et al., 2002).

5.10 Tumorsuppressive Funktionen von MK5

In dieser Arbeit wurden fast ausschließlich immortalisierte Tumorzelllinien für die Analyse verwendet. Primäre Zellen exprimieren verglichen mit Tumorzellen nur geringe Mengen an MK5-Protein (Daten nicht gezeigt). Die MK5-Depletion erhöht in primären Fibroblasten nicht die Myc-Proteinexpression (Daten nicht gezeigt). Der Rückkopplungsmechanismus scheint daher in primären Zellen nicht funktional zu sein.

Die Daten dieser Arbeit sprechen für eine tumorsuppressive Funktion von MK5 durch Repression der Myc-Proteinmengen. Die MK5-*Knockout*-Mäuse zeigen jedoch keine erhöhte spontane Tumorzinzidenz (Schumacher et al., 2004; Shi et al., 2003). Werden jedoch im Mausmodell durch die Behandlung mit dem Tumorigen DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracen) Papillome der Haut induziert, ist die Anzahl der Tumorbildungen in MK5-*Knockout*-Mäusen verglichen mit Kontrollmäusen signifikant erhöht (Sun et al., 2007). Bei der Doppelbehandlung mit DMBA und dem Tumorigen TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) war kein Unterschied zwischen Kontroll- und MK5-*Knockout*-Mäusen zu messen, was die tumorsuppressive Rolle von MK5 nicht bei der Tumorigenese, sondern beim Tumorzuchstum vorschlägt (Sun et al., 2007). Obwohl in der Arbeit von Sun et al. die Rolle von Myc nicht untersucht wurde, kann man davon ausgehen, dass in den Hautzellen der Kontrollmäuse die Aktivierung von MK5 neben den

beobachteten Effekten auch zur Verminderung der Myc-Proteinexpression führt. In MK5-*Knockout*-Mäusen jedoch fehlt diese Regulationsmöglichkeit, die Zellen exprimieren höhere Myc-Mengen und tragen zur Entstehung der Papillome und Karzinome bei. Die experimentelle Analyse dieser Hypothese steht noch aus.

Auch bei der Kolonkarzinominitiation spielt MK5 keine große Rolle. Vielmehr tritt erst bei fortgeschrittenen, schlecht differenzierten Adenokarzinomen ein MK5-Verlust auf (Abb. 28; siehe auch Abschnitt 5.7). Dies wurde durch immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten und durch mRNA-Expressionsstudien von Kolonkarzinomen belegt. Dass MK5 für die Tumorentstehung eine untergeordnete Rolle spielt, erklärt auch den fehlenden Tumorphänotyp der MK5-*Knockout*-Mäuse. Das Kreuzen der MK5-*Knockout*-Mäuse mit ausgewählten Mausmodellen könnte weitere Evidenzen zur Rolle von MK5 als Tumorsuppressor beitragen.

Für die Kolonkarzinomentwicklung gibt es mehrere Mausmodelle. Am häufigsten wird das APC^{Min}-Mausmodell (*multiple intestinal neoplasia*) eingesetzt. Es weist eine Nonsense-Mutation der Aminosäure 850 des Apc-Proteins auf, bei der das Codon für die Aminosäure Leucin durch ein Stoppcodon ersetzt wurde (Moser et al., 1995). Hierdurch entsteht das trunkierte APC^{Min}-Protein, das bei heterozygoter Expression innerhalb von wenigen Monaten zur Entstehung von bis zu 30 Adenomen im Dünn- und Dickdarm führt. Bei dem sogenannten APC^{580S}-Mausmodell wird das APC-Protein durch eine Verschiebung des Leserahmens trunkiert (Shibata et al., 1997). Durch diese Mutation entstehen intestinale Adenome bereits innerhalb von vier Wochen. In beiden Mausmodellen führt die Mutation des APC-Gens nur zur Entstehung von benignen Adenomen im Dünn- und Dickdarm. Die Kreuzung der MK5^{-/-}-Maus mit diesen beiden Mausmodellen würde die Entstehung von Adenokarzinomen begünstigen und somit ein Mausmodell für die Analyse von kolorektalen Karzinomen und möglichen Therapiemöglichkeiten darstellen. Hierfür würde sich das APC^{Min}-Mausmodell aufgrund der langsameren Adenomentwicklung besser eignen.

Anhand weiterer geeigneter Mausmodelle kann zudem die Rolle von MK5 bei Myc-induzierten Tumoren untersucht werden. In den Myc-Mausmodellen muss das MYC-Gen jedoch mit dem 3'-UTR exprimiert werden, da der negative Rückkopplungsmechanismus auf ein intaktes 3'-UTR angewiesen ist. Hierfür eignet sich z.B. das Eμ-Myc-Mausmodell, bei dem das MYC-Gen unter Kontrolle des Enhancers der schweren Immunglobulinkette exprimiert wird und somit zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen führt.

6. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Myc spielt eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum. Dabei ist das *MYC*-Gen in humanen Tumoren selten mutiert, sondern häufig sind Mechanismen der post-transkriptionellen Regulation der Myc-Proteinexpression verändert. Zur Identifikation unbeschriebener Mechanismen der Regulation der Myc-Proteinexpression wurde ein Immunfluoreszenz-basiertes Hochdurchsatzanalyse-Verfahren entwickelt und etabliert. Die Hochdurchsatzanalyse von RNAi-Bibliotheken, die das humane Kinom als Zielproteine auswiesen, identifizierte die Proteinkinase MK5/MAPKAPK5/PRAK als ein Enzym, das die Myc-Proteinexpression negativ reguliert. Die *MK5*-Depletion führt zu einer erhöhten Myc-Proteinexpression, während die *MK5*-Überexpression die Myc-Proteinexpression vermindert. Diese Myc-Regulation ist entscheidend am Zellwachstum von Tumorzelllinien beteiligt.

MK5 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor FoxO3a an mehreren, teilweise evolutionär hoch-konservierten Serin-Resten: S215, S253, S551, S555. Die Phosphorylierung von S215 wurde *in vivo* bestätigt und trägt wesentlich zur nukleären FoxO3a-Akkumulation bei. Nach Aktivierung durch MK5 bindet FoxO3a direkt an den Promotor der microRNAs miR-34b/c und induziert deren Expression. miR-34b und miR-34c binden an das 3'-UTR der *MYC*-mRNA und hemmen deren Translation und somit die Myc-Proteinexpression. Bei *MK5* handelt es sich um ein aktiviertes Zielgen des Myc-Transkriptionsfaktors, der direkt an die E-Box-Region innerhalb des *MK5*-Promotors bindet. Hierdurch ergibt sich ein negativer Rückkopplungsmechanismus bestehend aus Myc, MK5, FoxO3a und miR-34b/c.

Dieser negative Rückkopplungsmechanismus spielt eine entscheidende Rolle bei der Kolonkarzinogenese. Beim Übergang vom gut- zum schlecht-differenzierten kolorektalen Adenokarzinom wird die *MK5*-mRNA- und Proteinexpression vermindert. Hierdurch erhöht sich die Myc-Proteinexpression, was zur Tumorprogression und zur Metastasierung führt.

7. Literaturverzeichnis

- Aberg, E., Perander, M., Johansen, B., Julien, C., Meloche, S., Keyse, S. M., and Seternes, O. M. (2006). Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* 281, 35499-35510.
- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.
- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 635-645.
- Aguda, B. D., Kim, Y., Piper-Hunter, M. G., Friedman, A., and Marsh, C. B. (2008). MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19678-19683.
- Akao, Y., Nakagawa, Y., and Naoe, T. (2006). let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 29, 903-906.
- Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C. C., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1983). Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1707-1711.
- Amin, C., Wagner, A. J., and Hay, N. (1993). Sequence-specific transcriptional activation by Myc and repression by Max. *Mol Cell Biol* 13, 383-390.
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., *et al.* (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 7, 303-310.
- Aravin, A. A., Naumova, N. M., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rozovsky, Y. M., and Gvozdev, V. A. (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol* 11, 1017-1027.
- Arends, J. W. (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* 190, 412-416.
- Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C., and Larsson, L. G. (2000). c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* 95, 2104-2110.
- Batlle, E., Bacani, J., Begthel, H., Jonkheer, S., Gregorieff, A., van de Born, M., Malats, N., Sancho, E., Boon, E., Pawson, T., *et al.* (2005). EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 435, 1126-1130.
- Beer, S., Zetterberg, A., Ihrle, R. A., McTaggart, R. A., Yang, Q., Bradon, N., Arvanitis, C., Attardi, L. D., Feng, S., Ruebner, B., *et al.* (2004). Developmental context determines latency of MYC-induced tumorigenesis. *PLoS Biol* 2, e332.
- Bernards, R., Brummelkamp, T. R., and Beijersbergen, R. L. (2006). shRNA libraries and their use in cancer genetics. *Nat Methods* 3, 701-706.

- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bernstein, P. L., Herrick, D. J., Prokipcak, R. D., and Ross, J. (1992). Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev* 6, 642-654.
- Bhatia, K., Huppi, K., Spangler, G., Siwarski, D., Iyer, R., and Magrath, I. (1993). Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. *Nat Genet* 5, 56-61.
- Biggs, W. H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K., and Arden, K. C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7421-7426.
- Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250, 1149-1151.
- Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
- Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., Zhai, Y., Giordano, T. J., Qin, Z. S., Moore, B. B., *et al.* (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 17, 1298-1307.
- Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock, V., Loddenkemper, C., Eilers, M., and Schmitt, C. A. (2007). FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev* 21, 2775-2787.
- Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, R. H., and Eilers, M. (2004). Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J* 23, 2830-2840.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 18, 5321-5333.
- Bowman, T., Symonds, H., Gu, L., Yin, C., Oren, M., and Van Dyke, T. (1996). Tissue-specific inactivation of p53 tumor suppression in the mouse. *Genes Dev* 10, 826-835.
- Boxer, L. M., and Dang, C. V. (2001). Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20, 5595-5610.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brent, M. M., Anand, R., and Marmorstein, R. (2008). Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure* 16, 1407-1416.
- Brewer, G., and Ross, J. (1988). Poly(A) shortening and degradation of the 3' A+U-rich sequences of human c-myc mRNA in a cell-free system. *Mol Cell Biol* 8, 1697-1708.
- Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121-1124.

- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243-247.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., and Greenberg, M. E. (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 21, 952-965.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
- Burgering, B. M. (2008). A brief introduction to FOXology. *Oncogene* 27, 2258-2262.
- Cannell, I. G., Kong, Y. W., Johnston, S. J., Chen, M. L., Collins, H. M., Dobbyn, H. C., Elia, A., Kress, T. R., Dickens, M., Clemens, M. J., *et al.* (2010). p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5375-5380.
- Carter, P. S., Jarquin-Pardo, M., and De Benedetti, A. (1999). Differential expression of Myc1 and Myc2 isoforms in cells transformed by eIF4E: evidence for internal ribosome repositioning in the human c-myc 5'UTR. *Oncogene* 18, 4326-4335.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., and Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404, 245.
- Chan, C. H., Lee, S. W., Li, C. F., Wang, J., Yang, W. L., Wu, C. Y., Wu, J., Nakayama, K. I., Kang, H. Y., Huang, H. Y., *et al.* (2010). Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 12, 457-467.
- Chang, C. C., Huang, P. S., Lin, H. R., and Lu, C. H. (2007a). Transactivation of protein expression by rice HSP101 in planta and using Hsp101 as a selection marker for transformation. *Plant Cell Physiol* 48, 1098-1107.
- Chang, T. C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C. J., *et al.* (2007b). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26, 745-752.
- Chen, C. R., Kang, Y., Siegel, P. M., and Massague, J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 110, 19-32.
- Choi, S. H., Wright, J. B., Gerber, S. A., and Cole, M. D. (2010). Myc protein is stabilized by suppression of a novel E3 ligase complex in cancer cells. *Genes Dev* 24, 1236-1241.
- Christoffersen, N. R., Shalgi, R., Frankel, L. B., Leucci, E., Lees, M., Klausen, M., Pilpel, Y., Nielsen, F. C., Oren, M., and Lund, A. H. (2010). p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ* 17, 236-245.
- Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., and Burley, S. K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364, 412-420.
- Cole, M. D., and Cowling, V. H. (2009). Specific regulation of mRNA cap methylation by the c-Myc and E2F1 transcription factors. *Oncogene* 28, 1169-1175.

- Coller, H. A., Forman, J. J., and Legesse-Miller, A. (2007). "Myc'ed messages": myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron. *PLoS Genet* 3, e146.
- Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., and Eisenman, R. N. (2010). Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell* 142, 480-493.
- Conzen, S. D., Gottlob, K., Kandel, E. S., Khanduri, P., Wagner, A. J., O'Leary, M., and Hay, N. (2000). Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 6008-6018.
- Cortina, C., Palomo-Ponce, S., Iglesias, M., Fernandez-Masip, J. L., Vivancos, A., Whissell, G., Huma, M., Peiro, N., Gallego, L., Jonkheer, S., *et al.* (2007). EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells. *Nat Genet* 39, 1376-1383.
- Cowling, V. H., Chandriani, S., Whitfield, M. L., and Cole, M. D. (2006). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol* 26, 4226-4239.
- Cowling, V. H., and Cole, M. D. (2007). The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding. *Mol Cell Biol* 27, 2059-2073.
- Crews, S., Barth, R., Hood, L., Prehn, J., and Calame, K. (1982). Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas. *Science* 218, 1319-1321.
- D'Cruz, C. M., Gunther, E. J., Boxer, R. B., Hartman, J. L., Sintasath, L., Moody, S. E., Cox, J. D., Ha, S. I., Belka, G. K., Golant, A., *et al.* (2001). c-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations. *Nat Med* 7, 235-239.
- Dalla-Favera, R., Wong-Staal, F., and Gallo, R. C. (1982). Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature* 299, 61-63.
- Dang, C. V., and Lee, W. M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol* 8, 4048-4054.
- Dang, C. V., McGuire, M., Buckmire, M., and Lee, W. M. (1989). Involvement of the 'leucine zipper' region in the oligomerization and transforming activity of human c-myc protein. *Nature* 337, 664-666.
- Dang, C. V., O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 16, 253-264.
- Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R., and Bradley, A. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7, 671-682.
- Davis, L. J., and Halazonetis, T. D. (1993). Both the helix-loop-helix and the leucine zipper motifs of c-Myc contribute to its dimerization specificity with Max. *Oncogene* 8, 125-132.

- de Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., Van Montagu, M., Inze, D., and Castresana, C. (1992). Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J* 11, 2595-2602.
- de la Chapelle, A. (2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 769-780.
- Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L., and Coffey, P. J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 10, 1201-1204.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17, 438-442.
- Dominguez-Sola, D., Ying, C. Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D. A., Gu, W., Gautier, J., and Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448, 445-451.
- Doyle, G. A., Bourdeau-Heller, J. M., Coulthard, S., Meisner, L. F., and Ross, J. (2000). Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA-binding protein. *Cancer Res* 60, 2756-2759.
- Dubois, N. C., Adolphe, C., Ehninger, A., Wang, R. A., Robertson, E. J., and Trumpp, A. (2008). Placental rescue reveals a sole requirement for c-Myc in embryonic erythroblast survival and hematopoietic stem cell function. *Development* 135, 2455-2465.
- Eilers, M., and Eisenman, R. N. (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev* 22, 2755-2766.
- Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R., and Bishop, J. M. (1989). Chimeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* 340, 66-68.
- Ellis, L., Clauser, E., Morgan, D. O., Edery, M., Roth, R. A., and Rutter, W. J. (1986). Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell* 45, 721-732.
- Engel, F. B., Schebesta, M., Duong, M. T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J. B., Jiang, H., Wang, Y., and Keating, M. T. (2005). p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 19, 1175-1187.
- Erikson, J., Finger, L., Sun, L., ar-Rushdi, A., Nishikura, K., Minowada, J., Finan, J., Emanuel, B. S., Nowell, P. C., and Croce, C. M. (1986). Deregulation of c-myc by translocation of the alpha-locus of the T-cell receptor in T-cell leukemias. *Science* 232, 884-886.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- Facchini, L. M., Chen, S., and Penn, L. J. (1994). Dysfunction of the Myc-induced apoptosis mechanism accompanies c-myc activation in the tumorigenic L929 cell line. *Cell Growth Differ* 5, 637-646.
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

- Felsher, D. W., and Bishop, J. M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 4, 199-207.
- Finger, L. R., Huebner, K., Cannizzaro, L. A., McLeod, K., Nowell, P. C., and Croce, C. M. (1988). Chromosomal translocation in T-cell leukemia line HUT 78 results in a MYC fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9158-9162.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Flores, I., Murphy, D. J., Swigart, L. B., Knies, U., and Evan, G. I. (2004). Defining the temporal requirements for Myc in the progression and maintenance of skin neoplasia. *Oncogene* 23, 5923-5930.
- Gaestel, M. (2006). MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 120-130.
- Gaestel, M. (2008). Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo. *Front Biosci* 13, 6050-6059.
- Gallant, P., Shiio, Y., Cheng, P. F., Parkhurst, S. M., and Eisenman, R. N. (1996). Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* 274, 1523-1527.
- Gan, B., Lim, C., Chu, G., Hua, S., Ding, Z., Collins, M., Hu, J., Jiang, S., Fletcher-Sananikone, E., Zhuang, L., *et al.* (2010). FoxOs enforce a progression checkpoint to constrain mTORC1-activated renal tumorigenesis. *Cancer Cell* 18, 472-484.
- Gerits, N., Van Belle, W., and Moens, U. (2007). Transgenic mice expressing constitutive active MAPKAPK5 display gender-dependent differences in exploration and activity. *Behav Brain Funct* 3, 58.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421, 290-294.
- Gonzalez, S., Pisano, D. G., and Serrano, M. (2008). Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle* 7, 2601-2608.
- Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Ngouenet, C., Galloway, D. A., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 7, 311-318.
- Greer, E. L., and Brunet, A. (2008). FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol (Oxf)* 192, 19-28.
- Gu, S., and Kay, M. A. (2010). How do miRNAs mediate translational repression? *Silence* 1, 11.
- Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Nervi, C., Bernard, L., and Amati, B. (2006). Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 8, 764-770.
- Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.

- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., and Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-1150.
- Hann, S. R., Abrams, H. D., Rohrschneider, L. R., and Eisenman, R. N. (1983). Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. *Cell* 34, 789-798.
- Hann, S. R., and Eisenman, R. N. (1984). Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* 4, 2486-2497.
- Hann, S. R., Thompson, C. B., and Eisenman, R. N. (1985). c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature* 314, 366-369.
- Hannenhalli, S., and Kaestner, K. H. (2009). The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat Rev Genet* 10, 233-240.
- Hayward, W. S., Neel, B. G., and Astrin, S. M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* 290, 475-480.
- He, L., and Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5, 522-531.
- He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., *et al.* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.
- Herbst, A., Hemann, M. T., Tworowski, K. A., Salghetti, S. E., Lowe, S. W., and Tansey, W. P. (2005). A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* 6, 177-183.
- Herkert, B., Dwertmann, A., Herold, S., Abed, M., Naud, J. F., Finkernagel, F., Harms, G. S., Orian, A., Wanzel, M., and Eilers, M. (2010). The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. *J Cell Biol* 188, 905-918.
- Hermeking, H. (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17, 193-199.
- Herold, S., Hock, A., Herkert, B., Berns, K., Mullenders, J., Beijersbergen, R., Bernards, R., and Eilers, M. (2008). Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. *EMBO J* 27, 2851-2861.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H. P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* 10, 509-521.
- Hu, M. C., Lee, D. F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, F., Yang, J. Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., *et al.* (2004). IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117, 225-237.
- Hu, M. C., and Rosenblum, N. D. (2005). Smad1, beta-catenin and Tcf4 associate in a molecular complex with the Myc promoter in dysplastic renal tissue and cooperate to control Myc transcription. *Development* 132, 215-225.

- Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic, V., Scheuch, H., Beug, H., and Wagner, E. F. (2007a). p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet* 39, 741-749.
- Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E., and Wagner, E. F. (2007b). p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* 6, 2429-2433.
- Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.
- Iakova, P., Awad, S. S., and Timchenko, N. A. (2003). Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell* 113, 495-506.
- Ioannidis, P., Trangas, T., Dimitriadis, E., Samiotaki, M., Kyriazoglou, I., Tsiapalis, C. M., Kittas, C., Agnantis, N., Nielsen, F. C., Nielsen, J., *et al.* (2001). C-MYC and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. *Int J Cancer* 94, 480-484.
- Iversen, P. W., Eastwood, B. J., Sittampalam, G. S., and Cox, K. L. (2006). A comparison of assay performance measures in screening assays: signal window, Z' factor, and assay variability ratio. *J Biomol Screen* 11, 247-252.
- Izant, J. G., and Weintraub, H. (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36, 1007-1015.
- Jacobs, F. M., van der Heide, L. P., Wijchers, P. J., Burbach, J. P., Hoekman, M. F., and Smidt, M. P. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* 278, 35959-35967.
- Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., Sundberg, C. D., Bishop, J. M., and Felsher, D. W. (2002). Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297, 102-104.
- Johansen, L. M., Iwama, A., Lodie, T. A., Sasaki, K., Felsher, D. W., Golub, T. R., and Tenen, D. G. (2001). c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 21, 3789-3806.
- Jones, T. R., and Cole, M. D. (1987). Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences. *Mol Cell Biol* 7, 4513-4521.
- Kant, S., Schumacher, S., Singh, M. K., Kispert, A., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2006). Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* 281, 35511-35519.
- Karlsson, A., Giuriato, S., Tang, F., Fung-Weier, J., Levan, G., and Felsher, D. W. (2003). Genomically complex lymphomas undergo sustained tumor regression upon MYC inactivation unless they acquire novel chromosomal translocations. *Blood* 101, 2797-2803.
- Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., and Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35, 603-610.
- Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.
- Kim, S. Y., Herbst, A., Tworkowski, K. A., Salghetti, S. E., and Tansey, W. P. (2003). Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell* 11, 1177-1188.

- Kinsella, T. M., and Nolan, G. P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* 7, 1405-1413.
- Kong, Y. W., Cannell, I. G., de Moor, C. H., Hill, K., Garside, P. G., Hamilton, T. L., Meijer, H. A., Dobbyn, H. C., Stoneley, M., Spriggs, K. A., *et al.* (2008). The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8866-8871.
- Kops, G. J., Medema, R. H., Glassford, J., Essers, M. A., Dijkers, P. F., Coffey, P. J., Lam, E. W., and Burgering, B. M. (2002). Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* 22, 2025-2036.
- Kostenko, S., Johannessen, M., and Moens, U. (2009). PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell Signal* 21, 712-718.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Leeds, P., Kren, B. T., Boylan, J. M., Betz, N. A., Steer, C. J., Gruppuso, P. A., and Ross, J. (1997). Developmental regulation of CRD-BP, an RNA-binding protein that stabilizes c-myc mRNA in vitro. *Oncogene* 14, 1279-1286.
- Lehtinen, M. K., Yuan, Z., Boag, P. R., Yang, Y., Villen, J., Becker, E. B., DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T. K., and Bonni, A. (2006). A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* 125, 987-1001.
- Li, L. H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D., and Ziff, E. B. (1994). c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J* 13, 4070-4079.
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G., and Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 1686-1690.
- Liu, L., Rao, J. N., Zou, T., Xiao, L., Wang, P. Y., Turner, D. J., Gorospe, M., and Wang, J. Y. (2009). Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2-dependent HuR phosphorylation. *Mol Biol Cell* 20, 4885-4898.
- Lutterbach, B., and Hann, S. R. (1994). Hierarchical phosphorylation at N-terminal transformation-sensitive sites in c-Myc protein is regulated by mitogens and in mitosis. *Mol Cell Biol* 14, 5510-5522.
- Macrae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., and Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.
- Manke, I. A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M. Q., Elia, A. E., and Yaffe, M. B. (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell* 17, 37-48.

- Marcu, K. B., Bossone, S. A., and Patel, A. J. (1992). myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* *61*, 809-860.
- Marinkovic, D., Marinkovic, T., Mahr, B., Hess, J., and Wirth, T. (2004). Reversible lymphomagenesis in conditionally c-MYC expressing mice. *Int J Cancer* *110*, 336-342.
- McMahon, S. B., Wood, M. A., and Cole, M. D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* *20*, 556-562.
- Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., and Burgering, B. M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* *404*, 782-787.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A., and Matzke, A. J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* *19*, 5194-5201.
- Meyer, N., and Penn, L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* *8*, 976-990.
- Miao, H., and Wang, B. (2009). Eph/ephrin signaling in epithelial development and homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 762-770.
- Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B. M., and Milbrandt, J. (2002). FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem* *277*, 47928-47937.
- Morgenstern, J. P., and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* *18*, 3587-3596.
- Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A., McNeley, M. K., Shoemaker, A. R., and Dove, W. F. (1995). ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur J Cancer* *31A*, 1061-1064.
- Murphy, D. J., Junttila, M. R., Pouyet, L., Karnezis, A., Shchors, K., Bui, D. A., Brown-Swigart, L., Johnson, L., and Evan, G. I. (2008). Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell* *14*, 447-457.
- Nakamura, N., Ramaswamy, S., Vazquez, F., Signoretti, S., Loda, M., and Sellers, W. R. (2000). Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol* *20*, 8969-8982.
- Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., Kirsch, I. R., McBride, O. W., Bertness, V., Hollis, G. F., and Minna, J. D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* *318*, 69-73.
- New, L., Jiang, Y., and Han, J. (2003). Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases. *Mol Biol Cell* *14*, 2603-2616.
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L. J., Kato, Y., Parry, G. C., and Han, J. (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J* *17*, 3372-3384.
- Ni, H., Wang, X. S., Diener, K., and Yao, Z. (1998). MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* *243*, 492-496.

- Nilsson, J. A., and Cleveland, J. L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22, 9007-9021.
- Noubissi, F. K., Elcheva, I., Bhatia, N., Shakoori, A., Ougolkov, A., Liu, J., Minamoto, T., Ross, J., Fuchs, S. Y., and Spiegelman, V. S. (2006). CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature* 441, 898-901.
- Oster, S. K., Ho, C. S., Soucie, E. L., and Penn, L. Z. (2002). The myc oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res* 84, 81-154.
- Otto, T., Horn, S., Brockmann, M., Eilers, U., Schuttrumpf, L., Popov, N., Kenney, A. M., Schulte, J. H., Beijersbergen, R., Christiansen, H., *et al.* (2009). Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 15, 67-78.
- Paddison, P. J., Silva, J. M., Conklin, D. S., Schlabach, M., Li, M., Aruleba, S., Balija, V., O'Shaughnessy, A., Gnoj, L., Scobie, K., *et al.* (2004). A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 428, 427-431.
- Paik, J. H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J. W., Carrasco, D. R., *et al.* (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 128, 309-323.
- Paulin, F. E., West, M. J., Sullivan, N. F., Whitney, R. L., Lyne, L., and Willis, A. E. (1996). Aberrant translational control of the c-myc gene in multiple myeloma. *Oncogene* 13, 505-513.
- Pelengaris, S., Abouna, S., Cheung, L., Ifandi, V., Zervou, S., and Khan, M. (2004). Brief inactivation of c-Myc is not sufficient for sustained regression of c-Myc-induced tumours of pancreatic islets and skin epidermis. *BMC Biol* 2, 26.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. I. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321-334.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 3, 565-577.
- Penn, L. J., Brooks, M. W., Laufer, E. M., and Land, H. (1990). Negative autoregulation of c-myc transcription. *EMBO J* 9, 1113-1121.
- Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Gresh, L., Hui, L., Ballestar, E., Sousa-Victor, P., Baeza-Raja, B., Jardi, M., Bosch-Comas, A., Esteller, M., *et al.* (2007). Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *EMBO J* 26, 1245-1256.
- Perini, G., Diolaiti, D., Porro, A., and Della Valle, G. (2005). In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12117-12122.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J* 16, 5672-5686.
- Plas, D. R., and Thompson, C. B. (2003). Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem* 278, 12361-12366.
- Popov, N., Schulein, C., Jaenicke, L. A., and Eilers, M. (2010). Ubiquitylation of the amino terminus of Myc by SCFbeta-TrCP antagonizes SCFFbw7-mediated turnover. *Nat Cell Biol* 12, 973-981.

- Popov, N., Wanzel, M., Madiredjo, M., Zhang, D., Beijersbergen, R., Bernards, R., Moll, R., Elledge, S. J., and Eilers, M. (2007). The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nat Cell Biol* 9, 765-774.
- Prendergast, G. C., Lawe, D., and Ziff, E. B. (1991). Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* 65, 395-407.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R. J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16, 1247-1255.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., and Sellers, W. R. (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2, 81-91.
- Ramsay, G., Evan, G. I., and Bishop, J. M. (1984). The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7742-7746.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Roussel, M. F., Davis, J. N., Cleveland, J. L., Ghysdael, J., and Hiebert, S. W. (1994). Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1. *Oncogene* 9, 405-415.
- Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K., and Mo, Y. Y. (2009). p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3207-3212.
- Salazar, R., Roepman, P., Capella, G., Moreno, V., Simon, I., Dreezen, C., Lopez-Doriga, A., Santos, C., Marijnen, C., Westerga, J., *et al.* (2010). Gene Expression Signature to Improve Prognosis Prediction of Stage II and III Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*.
- Sampson, V. B., Rong, N. H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N. J., Dunn, S. P., and Krueger, L. J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* 67, 9762-9770.
- Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G. J., Lam, E. W., Burgering, B. M., and Medema, R. H. (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 22, 7842-7852.
- Schoenenberger, C. A., Andres, A. C., Groner, B., van der Valk, M., LeMeur, M., and Gerlinger, P. (1988). Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *EMBO J* 7, 169-175.
- Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A. D., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2004). Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J* 23, 4770-4779.
- Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Grzeschik, K. H., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Brodeur, G., and Trent, J. (1984). Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 308, 288-291.

- Schwinkendorf, D., and Gallant, P. (2009). The conserved Myc box 2 and Myc box 3 regions are important, but not essential, for Myc function in vivo. *Gene* 436, 90-100.
- Sears, R., Leone, G., DeGregori, J., and Nevins, J. R. (1999). Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* 3, 169-179.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14, 2501-2514.
- Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729-734.
- Seternes, O. M., Johansen, B., Hegge, B., Johannessen, M., Keyse, S. M., and Moens, U. (2002). Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress. *Mol Cell Biol* 22, 6931-6945.
- Seternes, O. M., Mikalsen, T., Johansen, B., Michaelsen, E., Armstrong, C. G., Morrice, N. A., Turgeon, B., Meloche, S., Moens, U., and Keyse, S. M. (2004). Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J* 23, 4780-4791.
- Shachaf, C. M., Kopelman, A. M., Arvanitis, C., Karlsson, A., Beer, S., Mandl, S., Bachmann, M. H., Borowsky, A. D., Ruebner, B., Cardiff, R. D., *et al.* (2004). MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 431, 1112-1117.
- Shaulian, E., Zauberman, A., Ginsberg, D., and Oren, M. (1992). Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 12, 5581-5592.
- Sheiness, D., Fanshier, L., and Bishop, J. M. (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol* 28, 600-610.
- Shen-Ong, G. L., Keath, E. J., Piccoli, S. P., and Cole, M. D. (1982). Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytomas. *Cell* 31, 443-452.
- Shi, Y., Kotlyarov, A., Laabeta, K., Gruber, A. D., Butt, E., Marcus, K., Meyer, H. E., Friedrich, A., Volk, H. D., and Gaestel, M. (2003). Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol Cell Biol* 23, 7732-7741.
- Shibata, H., Toyama, K., Shioya, H., Ito, M., Hirota, M., Hasegawa, S., Matsumoto, H., Takano, H., Akiyama, T., Toyoshima, K., *et al.* (1997). Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* 278, 120-123.
- Shiryaev, A., and Moens, U. (2010). Mitogen-activated protein kinase p38 and MK2, MK3 and MK5: menage a trois or menage a quatre? *Cell Signal* 22, 1185-1192.
- Siebenlist, U., Bressler, P., and Kelly, K. (1988). Two distinct mechanisms of transcriptional control operate on c-myc during differentiation of HL60 cells. *Mol Cell Biol* 8, 867-874.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.

- Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C. P., Finch, A. J., Murphy, D. J., Sodir, N. M., Karnezis, A. N., Swigart, L. B., Nasi, S., and Evan, G. I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* *455*, 679-683.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* *3*, 392-399.
- Steiger, D., Furrer, M., Schwinkendorf, D., and Gallant, P. (2008). Max-independent functions of Myc in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* *40*, 1084-1091.
- Stone, J., de Lange, T., Ramsay, G., Jakobovits, E., Bishop, J. M., Varmus, H., and Lee, W. (1987). Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Biol* *7*, 1697-1709.
- Stoneley, M., Paulin, F. E., Le Quesne, J. P., Chappell, S. A., and Willis, A. E. (1998). C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* *16*, 423-428.
- Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B. A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., *et al.* (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* *128*, 295-308.
- Tabara, H., Grishok, A., and Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* *282*, 430-431.
- Tak, H., Jang, E., Kim, S. B., Park, J., Suk, J., Yoon, Y. S., Ahn, J. K., Lee, J. H., and Joe, C. O. (2007). 14-3-3epsilon inhibits MK5-mediated cell migration by disrupting F-actin polymerization. *Cell Signal* *19*, 2379-2387.
- Takai, D., and Jones, P. A. (2003). The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol* *3*, 235-240.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 7837-7841.
- te Poele, R. H., and Joel, S. P. (1999). Schedule-dependent cytotoxicity of SN-38 in p53 wild-type and mutant colon adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* *81*, 1285-1293.
- Thompson, C. B., Challoner, P. B., Neiman, P. E., and Groudine, M. (1985). Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature* *314*, 363-366.
- Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., and Tokino, T. (2008). Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* *68*, 4123-4132.
- Underwood, K. W., Parris, K. D., Federico, E., Mosyak, L., Czerwinski, R. M., Shane, T., Taylor, M., Svenson, K., Liu, Y., Hsiao, C. L., *et al.* (2003). Catalytically active MAP KAP kinase 2 structures in complex with staurosporine and ADP reveal differences with the autoinhibited enzyme. *Structure* *11*, 627-636.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* *111*, 241-250.

- van den Heuvel, A. P., Schulze, A., and Burgering, B. M. (2005). Direct control of caveolin-1 expression by FOXO transcription factors. *Biochem J* 385, 795-802.
- van der Horst, A., and Burgering, B. M. (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 440-450.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J., and Luscher, B. (2006). The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem* 281, 34725-34729.
- Vincent, A., Perrais, M., Desseyn, J. L., Aubert, J. P., Pigny, P., and Van Seuning, I. (2007). Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells. *Oncogene* 26, 6566-6576.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Nakamura, Y., and White, R. (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244, 207-211.
- Vogt, P. K., Jiang, H., and Aoki, M. (2005). Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle* 4, 908-913.
- von der Lehr, N., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydbring, P., Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K. I., *et al.* (2003). The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell* 11, 1189-1200.
- Wanzel, M., Herold, S., and Eilers, M. (2003). Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* 13, 146-150.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., and Sanger, H. L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76, 567-576.
- Watson, D. K., Psallidopoulos, M. C., Samuel, K. P., Dalla-Favera, R., and Papas, T. S. (1983). Nucleotide sequence analysis of human c-myc locus, chicken homologue, and myelocytomatosis virus MC29 transforming gene reveals a highly conserved gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3642-3645.
- Wee, S., Wiederschain, D., Maira, S. M., Loo, A., Miller, C., deBeaumont, R., Stegmeier, F., Yao, Y. M., and Lengauer, C. (2008). PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13057-13062.
- Wei, J. S., Song, Y. K., Durinck, S., Chen, Q. R., Cheuk, A. T., Tsang, P., Zhang, Q., Thiele, C. J., Slack, A., Shohet, J., and Khan, J. (2008). The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene* 27, 5204-5213.
- Weigelt, J., Climent, I., Dahlman-Wright, K., and Wikstrom, M. (2001). Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). *Biochemistry* 40, 5861-5869.
- Welcker, M., Orian, A., Grim, J. E., Eisenman, R. N., and Clurman, B. E. (2004a). A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr Biol* 14, 1852-1857.
- Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J. E., Harper, J. W., Eisenman, R. N., and Clurman, B. E. (2004b). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9085-9090.
- Wianny, F., and Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2, 70-75.

- Wierstra, I., and Alves, J. (2008). The c-myc promoter: still Mystery and challenge. *Adv Cancer Res* 99, 113-333.
- Wu, R., Lin, L., Beer, D. G., Ellenson, L. H., Lamb, B. J., Rouillard, J. M., Kuick, R., Hanash, S., Schwartz, D. R., Fearon, E. R., and Cho, K. R. (2003). Amplification and overexpression of the L-MYC proto-oncogene in ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 162, 1603-1610.
- Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2004). Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* 23, 2116-2125.
- Yang, J. Y., Zong, C. S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J. Y., Lai, C. C., Chang, C. J., Huang, W. C., *et al.* (2008). ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol* 10, 138-148.
- Yano, T., Sander, C. A., Clark, H. M., Dolezal, M. V., Jaffe, E. S., and Raffeld, M. (1993). Clustered mutations in the second exon of the MYC gene in sporadic Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 8, 2741-2748.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W. C., Stukenberg, P. T., Shenolikar, S., Uchida, T., *et al.* (2004). A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* 6, 308-318.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zeller, K. I., Zhao, X., Lee, C. W., Chiu, K. P., Yao, F., Yustein, J. T., Ooi, H. S., Orlov, Y. L., Shahab, A., Yong, H. C., *et al.* (2006). Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17834-17839.
- Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4, 67-73.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Akt	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
Apc	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Arf	<i>alternate reading frame</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AzaC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BCR-ABL	<i>breakpoint cluster region-abelson</i>
Bim	<i>bcl-2 interacting protein</i>
BL21	Bakterienstamm zur Expression von GST-Fusionsproteinen
bleo	Bleomycin
BR	basische Region
BSA	bovines Serumalbumin
β -TrCP	<i>beta-transducin repeat containing protein</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CCND	Zyclin D
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> ; Zyclin-abhängige Kinase
CDKN1A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i> (p21)
CDKN1B	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i> (p27)

CDKN2B	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2B (p15)</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CDS	<i>coding sequence</i> ; kodierende Sequenz
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie; Einheit der Aktivität eines radioaktiven Stoffes
CMV	Cytomegalievirus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindedomäne
DCC	<i>deleted in colon carcinoma</i>
DH5 α	Bakterienstamm zur Herstellung und Amplifikation von DNA-Plasmiden
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat-Gemisch
DOC	<i>deoxycholate</i> ; Natriumdeoxycholat
Dox	Doxyzyklin
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E	Tag der Embryonalentwicklung
eco	ekotroph
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	<i>ethyleneglycoltetraacetic acid</i> ; Ethylenglykoltetraessigsäure
eIF	<i>eukaryotic translation initiation factor</i>
ELK1	<i>ETS-like gene 1</i>
ER	<i>estrogen receptor</i> ; Östrogenrezeptor

EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
F-Aktin	fibrilläres Aktin
FASLG	Fas-Ligand
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fötales Kälberserum
FBS	FoxO-Bindestelle
FBXW7	<i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>
Fox	<i>Forkhead-Box</i>
<i>FRE</i>	<i>FoxO-responsive element</i>
fwd	<i>forward</i> ; 5'-Primer
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G	Glycin
G1-Phase	Gap1-Phase
G2-Phase	Gap2-Phase
GCN	<i>general control non-derepressible</i>
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
H	Histon
HA	Hemagglutinin
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i> ; HEPES-gepufferte Salzlösung
HDM2	<i>human double minute 2</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix-Motiv
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
HuR	<i>Hu antigen R</i>
hygro	Hygromycin
IKK β	<i>IκB kinase beta</i>
IL-6	<i>interleukin 6</i>
IP	Immunpräzipitation
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> ; interne ribosomale Eintrittsstelle
IRS	<i>insulin-responsive sequence</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ktr	Kontrolle
l	Liter
L	Leucin
LB	<i>lysogeny broth</i> ; Nährmedium zur Bakterienkultur
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
Lowess	<i>locally weighted linear regression analysis</i> ; lokale lineare Regression
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LV	Leervektor
LZ	Leucin-Zipper
m	milli
μ	mikro
M	Methionin
M	molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Max	<i>Myc associated factor X</i>
MDM2	<i>murine double minute 2</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i> ; muriner embryonaler Fibroblast
min	Minute(n)
Min	<i>multiple intestinal neoplasia</i>
miR	microRNA
miRNA	microRNA
Miz1	<i>Myc interacting Zinc finger protein 1</i>
MK5	MAPKAPK5; <i>mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 5</i>
MKK6	<i>MAP kinase kinase 6</i>
MNK	<i>MAPK-interacting kinase</i>
Mo-MuLV	<i>Moloney murine Leukaemia Virus</i>
M-Phase	Mitosephase

mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
MSK	<i>mitogen and stress-activated kinase</i>
Mst1	<i>mammalian sterile 20-like 1</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MW	Mittelwert
Mxi1-SR α	<i>Max interacting protein 1 – strong repressor alpha</i>
n	nano
n	Probenanzahl
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
neo	Neomycin
NES	nukleäres Exportsignal
NF- κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NLS	nukleäres Lokalisationsignal
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus
OHT	4-Hydroxytamoxifen
p	pico
P	Prolin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHX	Phoenix; Zelllinie zur Herstellung von ekotrophen Retroviren
PI	Propidiumiodid
PI3K	<i>phosphoinositide-3-kinase</i>
PIN1	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, NIMA-interacting 1</i>
PIPES	<i>Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
PLK1	<i>polo-like kinase 1</i>
Pol	Polymerase
PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>
PRAK	<i>p38-regulated/activated kinase</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
puro	Puromycin

PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
R	Arginin
rev	<i>reverse</i> ; 3'-Primer
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROI	<i>region of interest</i>
RPMI	Zellkulturmedium
RPS14	ribosomales Protein S14
RSK	<i>ribosomal S6 kinase</i>
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
S	Schwefel
S	Serin
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGK	<i>serum/glucocorticoid-regulated kinase</i>
SH3	<i>Src homology domain 3</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> ; Haarnadel-RNA
siRNA	<i>small interfering RNA</i> ; kurze interferierende RNA
Skp2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
Sp-1	<i>specificity protein-1</i>
S-Phase	Synthese-Phase
T	Threonin
T	Thymin
t _{1/2}	Halbwertszeit
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Lösung
TBS-T	<i>tris buffered saline with Tween-20</i> ; Tris-gepufferte Lösung mit Tween-20

TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TGFβ	<i>transforming growth factor, beta</i>
TIP48	<i>TBP interacting protein, 48 kDa</i>
TIP60	<i>Tat interacting protein, 60 kDa</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRRAP	<i>transactivation/transformation-associated protein</i>
TRUSS	<i>tumor necrosis factor receptor-associated ubiquitous scaffolding and signaling protein</i>
TSA	Trichostatin A (Histondeacetylase-Inhibitor)
Tsc1	<i>tuberous sclerosis 1</i>
U	Aktivitätseinheit von Enzymen
U	Uracil
USP28	<i>ubiquitin-specific protease 28</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i> ; Volumen pro Volumeneinheit
w/v	<i>weight/volume</i> ; Gewicht pro Volumeneinheit
Y2H	<i>yeast 2 hybrid</i> ; Hefe-2-Hybrid
z.B.	zum Beispiel

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Theresia Kreß
geboren am 17. Februar 1982 in Schweinfurt
ledig

Schulbildung

September 1988 – Juli 1992 Grundschule Schwebenried
September 1992 – Juli 2001 Walther-Rathenau-Gymnasium Schweinfurt
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

Oktober 2001 – Juli 2004 Bachelor of Science, Biomedizin
Universität Würzburg
Abschluss: B. Sc.
Bachelorarbeit auf dem Gebiet der Nephrologie,
Universitätsklinikum Würzburg
Betreuung: Prof. Dr. Jan Galle

Oktober 2004 – April 2006 Master of Science, Biomedizin
Universität Würzburg
Abschluss: M. Sc.
Masterarbeit auf dem Gebiet der Molekularen
Onkologie, Weatherall Institute of Molecular
Medicine, Universität Oxford, Großbritannien
Betreuung: Dr. Stephan Feller

September 2006 – März 2011 Doktorarbeit auf dem Gebiet der Molekularen
Onkologie, Institut für Molekularbiologie und Tumor-
forschung, Universität Marburg, und Theodor-Boveri-
Institut, Universität Würzburg
Betreuung: Prof. Dr. Martin Eilers

8.3 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. Martin Eilers für die Bereitstellung des spannenden Projektes, für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen sowie für die kontinuierliche Hilfe. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Betreuung dieser Doktorarbeit. Ihm und Prof. Dr. Thorsten Stiewe danke ich auch für die hilfreichen Vorschläge und Anregungen in meinem Thesis-Komitee.

Ohne die Hilfe und Unterstützung zahlreicher Kollegen sowohl in Marburg als auch in Würzburg hätte diese Arbeit nicht gelingen können. Ich danke der ganzen AG Krause, vor allem Geli für mehr als nur die praktische Unterstützung beim *Screenen* und Birgit für die Datenanalyse. Ihr habt mich alle nett aufgenommen und mir das Leben in Marburg sehr erleichtert. Weiterhin danke ich Michael und Caroline, die mich zwischenzeitlich bei meinem Projekt unterstützt haben. Vielen Dank auch an Mona und alle Mitglieder der AGs Eilers, Stiewe und Bauer, die ich hier aus Platzgründen nicht namentlich erwähnen kann. Auch in Würzburg haben mir meine Kollegen der AGs Eilers, Popov, Murphy und Gallant sehr geholfen. Großer Dank gilt euch allen, besonders den Büro- und Laborkolleg(inn)en für die schöne Arbeitsatmosphäre. Die Arbeit hat mich euch zusammen wirklich Spaß gemacht. Jedoch möchte ich zusätzlich einige wenige Leute im Speziellen nennen. Dank gilt besonders Markus für die Freundschaft und das immer offene Ohr, der guten Seele Renate für alle Hilfe sowie Rosemarie für die Unterstützung bei allen organisatorischen Sachen. Und zu guter Letzt noch Danke an Markus, Steffi, Katrin und Laura für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ohne nationale und internationale Hilfe wäre auch mein Projekt nicht machbar gewesen. Danken möchte ich Prof. Dr. Andreas Rosenwald und Sabine Roth aus Würzburg, Prof. Dr. Matthias Gaestel aus Hannover, Dr. Martin Bushell und Dr. Ian Cannell aus Leicester, Prof. Dr. Boudewijn Burgerin, Dr. Arjan Brenkman und Dr. Harmjan Vos aus Utrecht sowie Dr. Paul Roepman aus Amsterdam.

Großer Dank gilt natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden: ohne sie wäre vieles unmöglich gewesen.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Theresia Kreß, dass ich meine Dissertation

Immunfluoreszenz-Basierte Hochdurchsatzanalyse Identifiziert MK5 als Myc-Regulierende Kinase

unter Leitung von Prof. Dr. Martin Eilers selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 11.02.2011

Theresia Kreß